

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**La peste porcina africana en el este de Europa: evolución de los
aislados circulantes y evaluación de las herramientas diagnósticas para
su control**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Virginia Pelayo Rincón

Directores

María Luisa Arias Neira
Carmina Gallardo Frontaura

Madrid, 2016



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA

LA PESTE PORCINA AFRICANA EN EL ESTE DE EUROPA:

**Evolución de los aislados circulantes y
evaluación de las herramientas diagnósticas
para su control**

Memoria de Tesis Doctoral

Virginia Pelayo Rincón,

Madrid 2015

Dirigida por:

Dra. María Luisa Arias Neira y Dra. Carmina Gallardo Frontaura

FUENTE DE LA IMAGEN:

©Saberia/ www.saberia.com

www.discoverseaz.com

www.dcn.davis.ca.us



D^ª María Luisa Arias Neira, Doctora en Ciencias y Directora técnica del Laboratorio de Referencia de la UE para la Peste Porcina Africana y del Centro de Referencia de la FAO para la Peste Porcina y

D^ª Carmina Gallardo Frontaura, Doctora en Ciencias , Coordinadora del Laboratorio de Referencia de la UE para la Peste Porcina Africana y del Centro de Referencia de la FAO para la Peste Porcina

CERTIFICAN

Que D^ª Virginia Pelayo Rincón, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el presente trabajo titulado: “LA PESTE PORCINA AFRICANA EN EL ESTE DE EUROPA: Evolución de los aislados circulantes y evaluación de las herramientas diagnósticas para su control”, considerando que reúne las condiciones necesarias para ser presentado como Tesis Doctoral.

En Madrid a 29 de Octubre de 2015

Dra. María Luisa Arias Neira

Dra. Carmina Gallardo Frontaura

Agradecimientos

Y cuando piensas que ya esta, que no hay que escribir más, te das cuenta de que toca la parte más difícil, cómo condensar en unas líneas años de convivencia, de risas, de agobios, de buenos y no tan buenos ratos, de crecimiento personal y profesional y de agradecer a mucha gente, que de forma completamente desinteresada, ha puesto su granito o montaña de arena en esta tesis.

En primer lugar querría agradecer a mis directoras de tesis todo su esfuerzo y dedicación para que este proyecto salga adelante. Gracias Marisa y gracias Carmina por todas vuestras enseñanzas a nivel académico y personal, por vuestra comprensión, por la confianza que habéis depositado en mí en todo momento y por darme la oportunidad de alcanzar esta meta.

A mis compañeros del L6, deciros sólo “gracias” se queda corto. La realización de esta tesis no hubiese sido posible sin todos y cada uno de vosotros. Por vuestro trabajo, por el cariño, por las risas y sobre todo por vuestra comprensión, por darle importancia a todo en su justa medida y por vuestra paciencia..... ¡Madre que últimos meses os he dado!. Por todo ello un beso muy grande y mil gracias, Alex, Cova, Alicia, Raquel y Elena. No sé que hubiera hecho estos años sin vosotros.

A las chicas del L17, que con un “dime, flor” y una sonrisa siempre me han ayudado con cualquier cosa que he necesitado durante este tiempo, gracias Ana, Amalia, Cris y Maia y por supuesto a ti, Jovi, que siempre me has enseñado con infinita amabilidad y paciencia. A las chicas del L20, Paloma, Mary y Mayte por ser compañeras de viaje y siempre estar ahí cuando parecía que peor estaban las cosas. También a los chicos de animalario, por cuidar tan bien de los animalitos y a todos los que formáis parte de esa familia que es el P3 del CISA, de una u otra forma, sois parte de esto, por los ratos vividos, los descansos, los consejos y las risas, por todo, gracias. A la “gente de fuera”, Ana, Julia, por las innumerables gestiones. Y también a ti, Tony siempre se agradecen los ánimos mañaneros. Muchas gracias también al grupo de Epidemiología y Sanidad animal del INIA-CISA por su ayuda con los mapas de epidemiología.

A mi familia, la que lo es por parentesco y la que lo es por decisión, muchas gracias por todo. A ti, Alicia, después de estos mil años que llevamos siendo amigas, por todo lo vivido y por los que nos queda!, gracias por hacer mi vida mejor. A vosotros, Dani, Carlos, Ana, Rosa, Héctor, Abi... gracias por formar parte de mi, por vuestra confianza, por seguir a mi lado a pesar de mis ausencias. A Carmen, por darme la primera oportunidad en este mundo, guiar mis primeros pasos y por seguir a mi lado después de tantos años.

También a mi familia política que me acogieron como una hija y hermana y con ellos siempre me he sentido como en casa.

A mis padres y a Elena por vuestro apoyo incondicional, por vuestros ánimos constantes, por creer en mí mucho más de lo que yo nunca llegaré a creer y por ver que esto era posible antes de que realmente lo fuese. Por TODO, con mayúsculas, muchas gracias. Y Eleniii, ... por fin vamos a poder ir a verte ¡que ganas tengo!. Tampoco me puedo olvidar de vosotras, ni de ti, abuela, que gran ejemplo eres! ni de ti, Tía Conchita, qué cantidad de velas empleadas en esta tesis! Y qué de preocupaciones...pero al final ¡ya está!.

Y por último a ti, Raúl, gracias por tantas cosas, por infinitas ... porque cuando sonríes parece que todo vuelve a estar en su sitio.

A todos vosotros y a los que por despiste me haya dejado en el tintero.

MUCHAS GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA Y HACER POSIBLE ESTE TRABAJO

A mis padres, a Elena y a Raúl

*"Dejamos de temer aquello que
se ha aprendido a entender"*

Marie Curie

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
RESUMEN	xiii
SUMMARY	xxi
 I-INTRODUCCIÓN.....	 1
1. EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA: ETIOLOGÍA.....	4
1.1. Estructura del genoma.....	5
1.2. Genes del vPPA: proteínas para las que codifican.....	7
1.2.1. Proteínas implicadas en la replicación.....	7
1.2.2. Proteínas estructurales y proteínas utilizadas en el diagnóstico.....	8
1.2.3. Proteínas moduladoras.....	8
1.3. Inmunidad e infección.....	9
2. EPIDEMIOLOGÍA y EVOLUCIÓN.....	11
2.1. Historia.....	11
2.1.1. Hasta 2007, en África, Europa, Sudamérica y Caribe.....	12
2.1.2. 2007-2014: la PPA en el Cáucaso y Este de Europa.	13
2.1.3. 2014 - 2015: entrada y expansión de la PPA en la UE.	18
2.2. Hospedadores.....	22
2.2.1. Vectores biológicos.....	25
2.2.2. Papel del jabalí europeo (<i>Sus scrofa</i>).....	26
2.3. Patogenia y manifestaciones clínicas de la enfermedad.....	27
2.4. Vías de transmisión.....	30
2.4.1. Ciclos de transmisión del vPPA en el hospedador.....	33
3. VIGILANCIA Y CONTROL DE LA PPA.....	35
3.1. Vacunas y estrategias vacunales.....	35
3.2. Puntos importantes en la prevención y control.....	36
4. DIAGNÓSTICO DE LA PPA.....	37
4.1. Técnicas de detección virológica.....	38
4.1.1. Test de la Hemoadsorción.....	39
4.1.2. Detección de antígenos virales.....	39
4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40

4.2. Técnicas de detección serológica.....	41
4.2.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....	42
4.2.2. Técnicas de confirmación serológica.....	43
4.3. Epidemiología molecular (genotipado).....	45
4.4. Problemas resueltos en las técnicas de diagnóstico.....	47
4.5. Algunos problemas a resolver.....	47
II-OBJETIVOS.....	49
III-MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
1. CULTIVOS CELULARES.....	55
1.1. Líneas celulares establecidas.....	55
1.1.1. Células Vero.....	55
1.1.2. Células “ <i>monkey stable</i> ”, MS.....	55
1.2. Cultivos primarios porcinos.....	55
1.2.1. Leucocitos porcinos.....	55
1.2.2. Macrófagos alveolares porcinos (MAP).....	55
2. AISLADOS VIRALES.....	56
2.1. Utilizados en los estudios de experimentación animal.	56
2.1.1. Arm07.....	56
2.1.2. Ukr12/Zapo.....	56
2.1.3. LT14/1490.....	56
2.2. Utilizados en la producción de reactivos y material de referencia.....	56
2.2.1. E70.....	56
2.2.2. E70 adaptado a células MS (E70MS).....	56
2.2.3. Ba 71 adaptado a células VR (Ba71VR).....	56
3. PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE AISLADOS DEL vPPA.....	57
3.1. En cultivos primarios.....	57
3.2. En líneas celulares establecidas.....	57
4. INFECCIONES EXPERIMENTALES.....	58
4.1. Animales.....	58
4.2. Diseño experimental.....	58
4.2.1. Infección experimental con el aislado Arm07.....	58
4.2.2. Infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo.....	58

4.2.3.	Infección experimental con el aislado LT14/1490.....	60
5.	MUESTRAS ANALIZADAS.....	60
5.1.	Muestras experimentales.....	60
5.2.	Muestras de campo.....	60
5.2.1.	Tratamiento de las muestras.....	61
5.3.	Muestras seleccionadas para el análisis comparativo de las técnicas de diagnóstico de la PPA.....	62
5.3.1.	Muestras seleccionadas para el análisis comparativo de las técnicas de diagnóstico virológico.....	62
5.3.2.	Muestras seleccionadas para el análisis comparativo de las técnicas de diagnóstico serológico	63
6.	TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL vPPA.....	63
6.1.	Técnicas de diagnóstico virológico.....	63
6.1.1.	Detección del genoma del vPPA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	63
6.1.1.1.	Extracción de ADN genómico.....	63
6.1.1.2.	PCR convencional OIE-PCR.....	63
6.1.1.3.	PCRs en tiempo real.....	64
6.1.1.4.	Controles empleados en las técnicas de PCR.....	65
6.1.2.	Aislamiento viral.....	66
6.1.3.	ELISA de Antígeno (Ingezim PPA DAS 11.PPA.K2, Ingenasa, Madrid, España).....	67
6.2.	Técnicas de diagnóstico serológico.....	67
6.2.1.	Técnicas de cribado (ELISA).....	67
6.2.1.1.	ELISA-OIE.....	67
6.2.1.2.	ELISAs comerciales.....	68
6.2.1.2.1.	®Ingezim PPA COMPAC 11.PPA.K3, Ingenasa (Madrid, España).....	68
6.2.1.2.2.	ID Screen ®African swine fever Indirect ELISA kit (IDvet, Grabels, Francia).....	69
6.2.1.2.3.	Svanovir ® ASFV-Ab ELISA (Svanova, Uppsala Suecia).....	69
6.2.2.	Técnicas de confirmación.....	69
6.2.2.1.	Immunoblotting (IB).....	69
6.2.2.2.	Immunoperoxidasa indirecta (IPT).....	70
6.2.2.2.1.	Preparación de las placas.	70

6.2.2.2.2.	Realización de la técnica de IPT.....	71
6.3.	Análisis estadístico.....	72
7.	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.....	73
7.1.	Genotipado convencional.....	73
7.2.	Regiones alternativas.....	74
7.3.	Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.....	76
IV-	RESULTADOS.....	79
1.	DIAGNÓSTICO DE LA PPA.....	81
1.1.	Diagnostico virológico.....	82
1.2.	Diagnostico serológico.....	83
1.3.	Diagnóstico final.....	84
1.4.	Caracterización molecular.....	84
1.4.1.	Resultados obtenidos mediante las técnicas de genotipado convencional.....	86
1.4.2.	Resultados obtenidos mediante el análisis de regiones alternativas del genoma del vPPA.....	90
1.4.3.	Resultados globales en los estudios de caracterización molecular de los aislados circulantes.....	91
2.	CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA DE AISLADOS CIRCULANTES DEL VIRUS DE LA PPA.....	93
2.1.	Infección experimental con el aislado Arm07 (Armenia).....	93
2.1.1.	Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia.....	93
2.1.2.	Examen <i>post-mortem</i> (lesiones macroscópicas).....	94
2.1.3.	Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral.....	94
2.1.4.	Resumen experiencia con el aislado Arm07.....	95
2.2.	Infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo (Ucrania).....	95
2.2.1.	Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia.....	95
2.2.2.	Examen <i>post-mortem</i> (lesiones macroscópicas).....	96
2.2.3.	Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral.....	97
2.2.4.	Resumen experiencia con el aislado Ukr12/Zapo.....	98
2.3.	Infección experimental con el aislado LT14/1490 (Lituania).....	98
2.3.1.	Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia.....	99
2.3.2.	Examen <i>post-mortem</i> (lesiones macroscópicas).....	99

2.3.3.	Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral.....	100
2.3.4.	Resumen experiencia con el aislado LT14/1490.....	102
3.	EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE PPA PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN EL ESTE DE EUROPA.....	103
3.1.	Técnicas de detección de virus: PCRs, ELISA de antígeno y aislamiento viral.....	103
3.1.1.	Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR y el ELISA de antígeno.....	103
3.1.1.1.	Muestras experimentales.....	103
a)	Muestras de sangre.....	103
b)	Muestras de tejidos.....	104
3.1.1.2.	Muestras de campo.....	105
3.1.1.3.	Análisis de los resultados.....	105
3.1.2.	Resultados comparativos obtenidos mediante la técnica de UPL-PCR y el aislamiento viral.....	106
3.2.	Técnicas de detección de anticuerpos: ELISAs e IPT.....	106
3.2.1.	Resultados comparativos obtenidos en muestras de suero.....	107
3.2.1.1.	Muestras experimentales.....	107
3.2.1.2.	Muestras de campo.....	107
3.2.1.3.	Análisis de los resultados.....	108
3.2.2.	Evaluación de la detección de anticuerpos en muestras alternativas de sangre y exudado de tejidos.....	108
3.2.2.1.	Muestras de campo.....	109
V-DISCUSIÓN.....		111
1. EVOLUCIÓN DE LA PPA EN EL ESTE DE EUROPA.....		114
1.1.	Cambios en la enfermedad observados a través de los resultados de las pruebas diagnosticas	114
1.2.	Caracterización genética	116
1.3.	Caracterización biológica.....	118
2. EVALUACIÓN DE TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DE PPA PARA LA DETECCIÓN DE LA ENFERMEDAD EN EL ESTE DE EUROPA.....		121
VI-CONCLUSIONES.....		129

VII-BIBLIOGRAFÍA.....	133
Protocolos disponibles en la página web del Laboratorio de Referencia Europeo para la Peste Porcina Africana.....	165
VIII-ANEXO I.....	167
Tabla de aislados secuenciados.	
IX-ANEXO II.....	179
Publicaciones relacionadas.	

%	Porcentaje
κ	Índice de concordancia Kappa
®	Marca registrada
°C	Grados centígrados
μl	Microlitro
μM	Micromolar
Ac	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AEC	Aminoetilcarbazol
Ag	Antígeno
Ag-CP	Antígeno soluble citoplasmático del VPPA
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BrEt	Bromuro de etidio
CD	Cerdo doméstico
CISA	Centro de Investigación en Sanidad Animal
CL	Control límite
Cl ₂ Mg	Cloruro de magnesio
cm ²	Centímetros cuadrados
CN	Control negativo
CNI	<i>Close- Neighbor –Interchange</i>
CO ₂	Dióxido de carbono
CP	Control positivo
CPA	Células presentadoras de antígenos
c.s.p.	Cantidad suficiente para
Ct	Ciclo umbral (“cycle threshold”)
C-terminal	Carboxi- terminal
CV	Controles de verificación internos
DG-SANTE	Dirección General de Salud y Seguridad Alimentaria
DMEM	Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco
dNTP	Desoxinucleótidos trifosfato
DO	Densidad óptica
Dpc	Días post contacto.
Dpi	Días post infección.
ECACC	<i>European Collection of Cell Cultures</i>
ECP	Efecto citopático
EDTA	Acido etilen-diamino-tetra-acetico
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción asociado a enzimas

EM	Evolución mínima
EMEM	Medio mínimo esencial de Eagle
EURL	Laboratorio de referencia Europeo para la Peste Porcina Africana
FAM	6-carboxifluoresceína
FP	Falso positivo
FR	Federación Rusa
G.	Ganglios
h	Horas
HAD	Hemoadsorción
HAD₅₀/ml	Dosis infectiva 50 de aislados hemoadsorbentes por mililitro
IB	Inmunoblotting
IC	Índice de concordancia
IFD	Immunofluorescencia directa
IFI	Immunofluorescencia indirecta
IFNγ	Interferon gamma
IgG	Inmunoglobulina G
im	Intramuscular
INIA	Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentación
IP	Índice de polidispersidad
IPT	Inmunoperoxidasa indirecta
JE	Jabalí europeo
kb	Kilobases
kDa	KiloDalton
Km	Kilómetros
MAP	Macrófagos alveolares porcinos
MEGA V6.0	<i>Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0</i>
mg	Miligramos
min	Minutos
ml	Mililitros
mM	Milimolar
moi	Multiplicidad de infección
NK	Células <i>natural killer</i>
nm	Nanómetros
nº	Número
OIE	Organización Mundial de Sanidad Animal (Oficina Internacional de Epizootías)
ORF	Fase de lectura abierta
-p	Nivel de significación
Pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PC	Punto de corte

PC-	Punto de corte negativo
PC+	Punto de corte positivo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PNT	Procedimiento normalizado de trabajo
PP	Valor porcentual de positividad
PP	Valor porcentual de positividad
PPA	Peste Porcina Africana
PPC	Peste Porcina Clásica
RCC	Región central constante
RCV	Región central variable
RD	Real Decreto
RIG	Región intergénica
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse	Ribonucleasa
RVC	Región variable derecha
RVI	Región variable izquierda
SFB	Suero fetal bovino
SFBi	Suero fetal bovino inactivado
SMF	Sistema mononuclear fagocitario
Sp	Especificidad
SRT	Secuencias repetidas en tándem
St.	San
TAMRA	Carboxi-tetra-metil-rodamina
TCID₅₀/ml	Dosis infectiva 50 por mililitro
Tm	Temperatura de fusión
U	Unidad de actividad enzimática
U.V.	Ultravioleta
UE	Unión Europea
UPL-PCR	PCR en tiempo real basada en el uso de una sonda universal
VPN	Valor predictivo negativo
VPP	Valor predictivo positivo
VPPA	Virus de la Peste Porcina Africana

Figura 1 →Micrografía del vPPA. A) Morfología del virión completo, aislado Ba71V (Rodríguez y col., 2009). B) Liberación del virus de una célula infectada (http://vetmed.illinois.edu/researchers-identify-proteins-that-may-lead-to-vaccine-for-african-swine-fever/).....	4
Figura 2 → Representación esquemática de la estructura del genoma del vPPA.....	5
Figura 3 → Mapa de la expansión de la PPA en la zona del Cáucaso durante los años 2007 y 2008.....	14
Figura 4a → Mapa de las localizaciones en las que se produjeron las notificaciones de PPA en la FR entre los años 2007 y 2010: Notificaciones PPA en negro ●. Distrito Federal del Cáucaso Norte (●), con la República de Osetia del Norte señalizada en verde claro (●), Distrito Federal Sur (●), Región de Leningrado, (●) Distrito Federal Noroeste, y Región de Oremburgo(●), Distrito Federal del Volga. Cortesía del grupo de Epidemiología y Sanidad animal del INIA-CISA. Fuente: ArcGIS 10.2. y datos OIE.....	15
Figura 4b → Mapa de las localizaciones en las que se produjeron las notificaciones de PPA en la FR entre los años 2007 y 2015: Notificaciones PPA en negro ●. Regiones afectadas del Distrito Federal Noroeste (●); Regiones afectadas del Distrito Federal Central (●); Regiones afectadas del Distrito Federal del Volga (●); Distrito Federal Sur (●) y Distrito Federal del Cáucaso Norte (●). Cortesía del grupo de Epidemiología y Sanidad animal del INIA-CISA. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE.....	16
Figura 5 → Mapa con los brotes declarados en Bielorrusia y Ucrania entre los años 2012 y 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	17
Figura 6 → Mapa con los brotes declarados en Polonia entre febrero de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	18
Figura 7 → Mapa con los brotes declarados en Lituania entre enero de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. Marcado con una flecha roja, el brote declarado en Ignalina. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE Creación propia.....	19

Figura 8→ Mapa con los brotes declarados en Letonia entre junio de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	20
Figura 9→ Mapa con los brotes declarados en Estonia entre septiembre de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	21
Figura 10→ Mapa con las notificaciones declaradas a la OIE dentro del territorio de la UE entre enero de 2014 y agosto de 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	21
Figura 11→ Mapa con los brotes en cerdo doméstico declarados en la UE clasificado por tipo de unidad epidemiológica: unidades de traspaso (●) vs explotaciones (●). Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	35
Figura 12→ Hemoadsorción típica del vPPA.....	66
Figura 13→ Resultados positivo (izquierda) y negativo (derecha) en la técnica de la IPT.....	72
Figura 14→ Localización en el genoma del vPPA de las tres regiones variables analizadas dentro de la región EcoRI (Rodríguez y col., 1992).....	75
Figura 15→ Representación esquemática del número de casos en jabalíes (A) y brotes en cerdo doméstico (B) recibidos en el EURL de cada uno de los países de la UE en relación al número total de casos/brotes declarados a la OIE. En la parte inferior se muestra el porcentaje total por país.....	81
Figura 16→ Localización de los virus secuenciados procedentes de jabalí europeo (A) y brotes en cerdo doméstico (B) seleccionados de las muestras recibidas en el EURL de los brotes/casos en el este de Europa desde el 2012 hasta agosto del 2015. En la figura se detalla el número de virus secuenciados por país.....	85
Figura 17→ Árbol filogenético construido con el método de ME basado en las distancias genéticas de las secuencias en nucleótidos del extremo carboxi-terminal de la proteína p72 del vPPA. Los números en los nodos corresponden a la frecuencia con la que aparecen los grupos en el análisis de “bootstrap” de 1000	

repeticiones (sólo se muestran ≥ 50). De forma resumida se han agrupado los virus secuenciados de Lituania (▲), Polonia (◆), Estonia (■), Letonia (●), Ucrania (○) y Bielorrusia (▲) por hospedador (WB =jabalí europeo; DP =cerdo doméstico), año y localización. En ● se muestran los aislados incluidos dentro del estudio circulando en el este de Europa desde el 2007.....	87
Figura 18→ Diferencias en el tamaño de los amplicones obtenidos mediante la amplificación de la RCV en un gel de agarosa al 2%. Se muestran aislados representativos del genotipo II de (1) Armenia (Arm07), (2) Azerbaiyán (Az08), (3) Ucrania (Ukr12/Zapo), (4) Bielorrusia (Bel13/Grodno), (5) Lituania (LT14/1490), (6) Polonia (Pol14/Sz) y (7) Letonia (Lv14/DP/Robez1).....	88
Figura 19→ Mapa con la localización del aislado Est15/WB-Tartu1, y gel de agarosa al 2% en el que se muestra la diferencia de tamaño con el aislado del genotipo II de Armenia (Arm07). Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.....	89
Figura 20→ Alineamiento de los aminoácidos de la RCV del aislado Est15/WB-Tartu1 comparado con la secuencia del resto de aislados del genotipo II que circulan en este de Europa desde 2007. En colores aparecen representados las secuencias tetraméricas repetidas. Clave: B (CADT); N (NVDI); D (CASM); A (CAST); a (CTST).....	90
Figura 21→ Alineamiento parcial de las secuencias de la región intergénica I73R-I329L de los aislados pertenecientes al genotipo II, incluido el aislado de Georgia 2007. De forma resumida se han agrupado los aislados de Lituania, Polonia, Estonia, Letonia y Ucrania por hospedador y año.....	91
Figura 22→ (a) Temperatura media y (b) tasa de supervivencia de los animales inoculados y los contactos. La línea amarilla marca la fiebre, considerada a partir de 40°C. El proceso de hipotermia sufrido por uno de los animales inoculados el día del sacrificio está indicado cómo (--).....	93
Figura 23 → Detalle de lesiones macroscópicas a) esplenomegalia hiperérmica en el día 7pi, b) linfadenitis hemorrágica del ganglio gastro-hepático 9dpi y c) petequias en pulmón 16 dpc.....	94
Figura 24→ (a) Viremia determinada mediante la PCR en tiempo real de la OIE y (b) título viral expresado en UHAD50/ml a los diferentes días post infección/contacto en los animales inoculados y contacto.....	94
Figura 25→ a) Valoración clínica y b) tasa de supervivencia en el grupo de animales inoculados y contacto.....	96

Figura 26 → Detalle de lesiones macroscópicas a) hemorragias en intestino a 4dpi, b) linfadenitis hemorrágica del ganglio gastro-hepático 9dpi y c) hemorragias en la corteza y en la pelvis renal 12dpc.....	97
Figura 27→ a) Viremia determinada por PCR en tiempo real (OIE-PCR) y b) título viral expresado en UHAD50/ml en el grupo de animales inoculados y contacto	98
Figura 28→ a) Media de la valoración clínica, y b) tasa de supervivencia en el grupo de animales inoculados y contacto . En un círculo en rojo figura el animal L6, que a pesar de ser inoculado presentó un patrón de infección semejante a los animales contacto (infección natural).....	99
Figura 29→ Detalle de las lesiones hemorrágicas en los ganglios extraídos a uno de los animales infectados con el aislado LT14/1490: ganglios retro faríngeo, renal, mesentérico y gastro-hepático agrandados y completamente hemorrágicos; inguinal agrandado y sólo parcialmente hemorrágico y esplénico y mediastino únicamente agrandados.....	100
Figura 30→ Detalle de la esplenomegalia hiperémica encontrada en el animal contacto CL18 sacrificado el día 61 pc.....	100
Figura 31→ Evolución de los síntomas clínicos de los dos grupos de animales infectados con el aislado lituano LT14/1490 considerando el L6 (inoculado) como parte del grupo de contacto en comparación con la viremia obtenida mediante PCR en tiempo real (UPL-PCR)	101

Tabla I → Tiempos de supervivencia del vPPA a distintas condiciones ambientales y en productos cárnicos. Fuente: EFSA, 2010 (trabajos de Adkin y <i>col.</i> , 2004; Mebus y <i>col.</i> , 1993 y, 1997).....	30
Tabla II → Síntomas clínicos considerados para analizar la evolución de la enfermedad en la infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo.....	59
Tabla III → Número de animales recibidos por país y por año.....	61
Tabla IV → Descripción del número y tipo de muestras analizadas por país y año.....	61
Tabla V → Desglose del tipo de tejidos recibido en el EURL.....	61
Tabla VI → Descripción de las muestras experimentales obtenidas de cerdos domésticos infectados con los aislados del vPPA del genotipo II.....	62
Tabla VII → Características de las sondas y cebadores empleados en las PCRs en tiempo real.....	65
Tabla VIII → Tabla 2x2 empleada en el cálculo de concordancia.....	72
Tabla IX → Grado de concordancia entre dos técnicas en función del valor de Kappa.....	73
Tabla X → Descripción de los cebadores empleados en el genotipado convencional....	73
Tabla XI → Cebadores empleados en la caracterización molecular utilizando regiones alternativas del genoma del vPPA.....	75
Tabla XII → Reactivos y concentraciones empleadas en las mezclas de reacción utilizadas en la caracterización molecular de regiones alternativas.....	76
Tabla XIII → Resultados comparativos en la detección del genoma del vPPA mediante las técnicas de PCR en tiempo real.....	82
Tabla XIV → Diagnóstico virológico final (UPL-PCR) en el total de los animales recibidos.....	83
Tabla XV → Detección de anticuerpos específicos frente a vPPA mediante la técnica de la IPT.....	83
Tabla XVI → Resultados comparativos mediante las técnicas de IPT, ELISA e IB e en la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA en 108 muestras de campo. En paréntesis se indica el total de muestras analizadas en paralelo.....	83
Tabla XVII → Diagnóstico serológico final en el total de los animales recibidos.....	84

Tabla XVIII→ Aislados del vPPA del este de Europa del genotipo II desde el 2007 hasta el 2012 disponibles en la base de datos del EURL y utilizados en los estudios de caracterización molecular.....	85
Tabla XIX→ Secuencia en aminoácidos de las repeticiones tetraméricas dentro de la región variable central (RCV) del gen B602L identificadas en los virus pertenecientes al genotipo II de la p72 del este de Europa. Clave: B (CADT); N (NVDI); D (CASM); A (CAST); a (CTST)	89
Tabla XX→ Clasificación molecular de los aislados del este de Europa de cerdo doméstico (CD) y jabalí europeo (JE) secuenciados desde el año 2007 hasta agosto del 2015. De forma resumida se han agrupado los aislados de Lituania, Polonia, Estonia, Letonia y Ucrania por hospedador y año, a excepción del aislado estonio Est15/WB-Tartu1.....	92
Tabla XXI→ Título de virus obtenidos a partir de los bazos de los animales infectados con el aislado Ukr12/Zapo.....	97
Tabla XXII→ Detección de anticuerpos frente al vPPA. Resultados comparativos obtenidos mediante IPT y ELISA en las muestras de suero obtenidas a distintos dpi/dpc en los animales que seroconvirtieron. En gris claro se indica el resultado positivo inicial mediante PCR.....	101
Tabla XXIII→ Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR en tiempo real (UPL-PCR y OIE-PCR), la PCR convencional de la OIE y el ELISA comercial de antígeno para la detección del vPPA en muestras de sangre (a) y tejidos (b) obtenidos de animales infectados experimentalmente con aislados del genotipo II...	104
Tabla XXIV→ Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR en tiempo real (UPL-PCR y OIE-PCR), la PCR convencional de la OIE y el ELISA comercial de antígeno para la detección del vPPA en muestras de campo.....	105
Tabla XXV→ Resultados comparativos de sensibilidad (Ss) obtenidos utilizando las técnicas de PCR prescritas por la OIE y el ELISA de antígeno comercial en el análisis de 797 muestras, de campo y experimentales clasificadas como positivas mediante la técnica de UPL-PCR.....	106
Tabla XXVI→ Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de ELISA en los sueros experimentales clasificados como positivos mediante la IPT.....	107
Tabla XXVII→ Resultados comparativos obtenidos en el análisis de 21 sueros de utilizando cada uno de los ELISAS y la IPT.....	108

Tabla XXVIII → Número de muestras positivas procedentes de animales infectados vs muestras positivas procedentes de animales no infectados utilizando cada una de las técnicas evaluadas.....	109
--	-----

RESUMEN

LA PESTE PORCINA AFRICANA EN EL ESTE DE EUROPA: Evolución de los aislados circulantes y evaluación de las herramientas diagnósticas para su control.

La Peste Porcina Africana (PPA) es una enfermedad porcina de etiología vírica muy compleja, de carácter infecto-contagioso, para la que actualmente no existe vacuna. Por su gran importancia económica y sanitaria aparece incluida dentro del grupo de enfermedades de declaración obligatoria de la lista de la OIE y de la Unión Europea y su presencia conduce a restricciones inmediatas sobre el comercio de cerdo y productos derivados.

Está causada por el virus de la Peste porcina africana (vPPA), un virus ADN de gran tamaño y estructura compleja, que presenta una envuelta lipoprotéica y una elevada variabilidad genética y antigénica, con 22 genotipos diferentes descritos hasta la fecha. Pertenece a la familia *Asfarviridae*, genero *Asfivirus*, de la que es el único integrante.

Actualmente está presente en 22 países del África subsahariana, en la isla de Cerdeña, Italia, y desde su introducción en Georgia en 2007, tanto en la región transcaucásica como en el centro y sur de la zona occidental de la Federación Rusa (FR). La compleja situación epidemiológica de la PPA en el este de Europa, con focos continuados en la FR y afectando también a otros países vecinos de la UE como Bielorrusia y Ucrania, originó finalmente la entrada de la enfermedad en varios países de la UE en 2014, Lituania, Polonia, Letonia y Estonia en los que, hasta agosto de 2015, se realizaron más de 1000 notificaciones principalmente en jabalí, y en mucha menor medida en cerdo doméstico.

Únicamente las especies de la familia *Suidae* y a las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* son infectadas de forma natural por el vPPA. En cerdos domésticos y jabalíes europeos las manifestaciones clínicas de la enfermedad son variables. Por el contrario, los suidos silvestres africanos son resistentes a la infección, habitualmente con cursos clínicos de tipo inaparente.

Aunque la mortalidad y los signos clínicos dependen de varios factores como el hospedador, dosis, vía de exposición y la virulencia del aislado, en sus formas agudas la PPA se caracteriza por originar lesiones de carácter congestivo-hemorrágico de curso generalmente fatal y una letalidad cercana al 90 e incluso al 100%. El patrón de evolución de la PPA en zonas endémicas muestra un aumento de formas subagudas, causadas por virus virulentos y moderadamente virulentos, formas crónicas y formas de tipo subclínico, con tasas de letalidad menores del 20%. El vPPA induce una infección persistente, por lo que los animales supervivientes recuperados de la infección, son capaces de transmitir el virus durante varios meses y mantener así la enfermedad entre la población porcina.

Dado que en la actualidad no existe una vacuna disponible contra la PPA, una detección temprana en el campo y un diagnóstico fiable de laboratorio son factores determinantes, entre otros, para conseguir un control efectivo de la enfermedad, evitar su propagación y abordar con garantías el establecimiento de programas de erradicación. De hecho el diagnóstico laboratorial es

particularmente importante debido a la similitud de los signos clínicos que presentan las formas agudas y subagudas de la enfermedad con otras enfermedades hemorrágicas porcinas como la Peste Porcina Clásica, mal rojo, erisipela o incluso con procesos septicémicos agudos o envenenamientos.

Hoy en día se dispone de un gran abanico de técnicas para la detección tanto del virus como de los anticuerpos específicos. Estas técnicas permiten de forma segura y fiable la detección tanto de animales infectados como de los supervivientes. Entre las técnicas más utilizadas actualmente para la detección del virus, destacan el test de la hemoadsorción, la Inmunofluorescencia directa, el ELISA de Antígeno y principalmente la PCR, que permite detectar el genoma viral de forma rápida y eficaz en una amplia variedad de muestras.

Dentro de las técnicas de detección serológica mas empleadas actualmente están el ELISA, utilizada como técnica de cribado, y el Inmunoblotting (IB), la Inmunoperoxidasa indirecta (IPT) o la Inmunofluorescencia indirecta (IFI), empleadas para confirmar todos aquellos resultados positivos o dudosos en ELISA.

Para poder establecer la trazabilidad de un foco son necesarios estudios moleculares basados en el análisis de varias regiones del genoma del vPPA. Entre ellas encontramos las regiones incluidas en el genotipado convencional establecido hace una década y que abarca la secuencia parcial del extremo C-terminal del gen *B646L*, que permite diferenciar y clasificar aislados genéticamente diversos e incluirlos en uno de los 22 genotipos actualmente establecidos, el gen *E183L* o la región central variable (RCV) situada dentro del gen *B602L* y rica en secuencias repetidas en tándem (SRT), que facilita la diferenciación entre aislados muy relacionados. A pesar de la información que se obtiene del análisis de estas tres regiones, en ocasiones se requiere de información adicional para poder rastrear la propagación del virus en una misma región. Recientemente se han descrito regiones alternativas, en la denominada región Eco-RI, caracterizadas también por la presencia de SRT.

Objetivos planteados y resultados:

Para poder lograr un control efectivo de la enfermedad es fundamental conocer las características de los aislados circulantes y de la infección en el hospedador. Esta información es posible obtenerla a través de la caracterización molecular de los aislados, de la experimentación “*in vivo*” con dichos aislados y mediante análisis epidemiológicos y de diagnóstico. Las herramientas de detección diagnóstica juegan un papel esencial y por ello es fundamental contar con técnicas rápidas, sensibles, específicas y fiables, que permitan una detección temprana en los diferentes escenarios epidemiológicos. Por ello los objetivos principales de este trabajo doctoral se han centrado en **a)** la caracterización de los aislados circulantes del vPPA, a nivel biológico y molecular y de su evolución en la epizootia en el este de Europa, **b)** la evaluación de las herramientas diagnósticas disponibles en el análisis de los brotes epidémicos en el este de la UE y

su adecuación al uso de nuevos tipos de muestras alternativas, mediante el análisis del curso de la infección por el vPPA en jabalí y en cerdo doméstico en el este de Europa.

Los resultados del análisis de 663 muestras de campo de 367 animales (284 jabalíes y 83 cerdos domésticos) enviadas desde Ucrania, Bielorrusia, Estonia, Letonia, Polonia y Lituania entre los años 2012 y 2015 mostraron la presencia del genoma del vPPA en un 94% de los animales analizados, que incluyeron la totalidad de cerdos domésticos y el 92,2% de los jabalíes. El virus se consiguió aislar en cultivos primarios de leucocitos y/o macrófagos en 47 de los 57 cerdos domésticos analizados y de 67 de los 216 jabalíes. **Todos los aislados obtenidos presentaron un patrón hemoadsorbente.**

La presencia de anticuerpos se confirmó en 178 de los 350 animales analizados (50,9%), de los que 145 (53,3%) fueron jabalíes, y 33 (42,3%) cerdos domésticos. Estos últimos además, presentaron títulos de anticuerpos más bajos. Un resultado que merece la pena destacar es que en el 27% (39 de 145) de los jabalíes seropositivos se obtuvo un resultado positivo débil o negativo en PCR.

El **genotipado** convencional permitió clasificar todas las muestras secuenciadas dentro del genotipo II de la p72, con un 100% de homología con los aislados del vPPA circulantes en el este de Europa, incluido el primer aislado que se obtuvo en Georgia en 2007. También permitió establecer la existencia de dos variantes del vPPA en relación a la RCV. La variante GII-CVR1 en la que se incluyen todos los virus secuenciados desde 2007 del este de Europa excepto uno. Presenta un fragmento de alrededor de 500 pb con una secuencia de diez copias de tetrámeros de aminoácidos del tipo BNDBNDBNAA, característica de los aislados africanos obtenidos de las islas de Madagascar y Mozambique e idéntica a la secuencia del aislado de Georgia 2007. La variante GII-CVR2 mostró un amplicón de tamaño algo menor de 400pb, que traducido en aminoácidos reveló 7 copias de tetrámeros en lugar de 10. Esta segunda variante, representada por un único aislado hasta la fecha (15 agosto 2015) se obtuvo recientemente de la médula ósea de un jabalí infectado en Estonia.

Para establecer los **vínculos epidemiológicos y filogenéticos** entre aislados con un elevado grado de homología, se han analizado tres regiones alternativas localizadas en el fragmento EcoRI-I. Entre ellas destacamos la región intergénica situada entre los genes *I73R/I329L*, con la que se han podido establecer diferencias entre los aislados circulantes en Europa desde 2007. Los resultados mostraron que los virus procedentes de Ucrania, Bielorrusia y los países afectados de la UE presentan una inserción de 10 nucleótidos (GGAATATATA) de la que carecían los aislados de Georgia, Armenia, Azerbaiyán y los analizados en la FR hasta 2012, año a partir del cual, y de acuerdo con las referencias, comienza la coexistencia de las dos variantes en algunas zonas del país.

La infecciones experimentales “in vivo” realizadas con los aislados Arm07 (Armenia), Ukr12/Zapo (Ucrania) y LT14/1490 (Lituania) con el fin de obtener información acerca de la

virulencia, aspectos clínicos y patológicos de la infección, respuesta inmunológica desencadenada en el hospedador y parámetros de transmisión, revelaron un patrón agudo (Arm07 y LT14/1490) o hiperagudo (Ukr12/Zapo) de la PPA, con tasas de mortalidad del 100% observadas en los aislados Arm07 y Ukr12/Zapo y del 94,5% en LT14/1490. En este último, uno de los animales contacto con infección demostrada, permaneció asintomático durante toda la experiencia hasta su sacrificio a los 61 días post infección.

En las experiencias “*in vivo*” con los aislados Arm07 y LT14/1490, los animales mostraron signos clínicos asociados a la PPA aguda que aparecieron tras un período de incubación corto y los animales murieron o fueron sacrificados 4 ± 1 días después de la aparición de los signos clínicos. Por el contrario, los animales inoculados con el aislado Ukr12/Zapo presentaron síntomas clínicos variables y murieron en un lapso de tiempo inferior a los 7 días desde la infección (excepto uno, que murió el día 10), incluso sin presentar ninguna sintomatología clínica en algunos casos.

En relación a las pruebas diagnósticas, la viremia se detectó con facilidad en todos los animales pudiéndose aislar el virus de todos los animales a excepción del animal asintomático. Éste presentó una viremia débil e intermitente y únicamente se detectó el genoma del vPPA en 9 de los 20 tejidos analizados. La respuesta de anticuerpos se observó en un animal contacto en la experiencia con el aislado Arm07 (16,6%) y 6 con el aislado LT14/1490 (33%).

En las necropsias también se observaron lesiones compatibles con la forma aguda de la PPA, principalmente hemorragias internas generalizadas con esplenomegalia, linfadenitis hemorrágica y petequias en riñón y en pulmón, incluso en el animal asintomático, que mostró esplenomegalia hiperémica, petequias en pulmón y hemorragias en los ganglios linfáticos

En relación a **la evaluación de las técnicas de diagnóstico**, se compararon tres PCR's diferentes (la UPL-PCR y las PCR's convencional y en tiempo real prescritas por la OIE) utilizando 785 muestras de campo y experimentales. Los resultados mostraron un grado de concordancia casi perfecto entre la UPL-PCR y las PCR's prescritas por la OIE con valores de κ de 0,94 IC del 95% [0,91; 0,97] al comparar la UPL-PCR con la PCR en tiempo real y de 0,88 IC del 95% [0,83; 0,92] al comparar la UPL-PCR con la convencional, aunque la UPL-PCR presentó una mayor sensibilidad diagnóstica en la detección de portadores y permitió una detección más temprana de la infección. La concordancia entre la UPL-PCR y el ELISA de antígeno se puede considerar buena, con un valor de $\kappa = 0,67$ IC del 95%, [0,58; 0,76].

Para la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA se evaluaron tres ELISAs comerciales, el ELISA indirecto prescrito por la OIE y la IPT. La sensibilidad de esta última fue mayor que cualquiera de los ELISAs ya que fue capaz de detectar anticuerpos específicos a tiempos más tempranos de infección, cuando la respuesta inmunológica está comenzando y existen pocos anticuerpos. La IPT se ha mostrado como herramienta serológica de gran utilidad en la detección de anticuerpos en **muestras alternativas** al suero, como sangre o exudado de tejidos. En el análisis realizado sobre un total de 90 exudados obtenidos de 30 animales infectados y 210

exudados de animales negativos a PPA, esta técnica presentó una sensibilidad del 22,2%, algo menor que la del ELISA de bloqueo de Ingenasa testado (27,7%) pero con una especificidad del 100% frente al 84,3% del ELISA de bloqueo comercial. Por su sensibilidad y especificidad, la IPT junto con la UPL-PCR son las técnicas más idóneas para estudios de dinámica de la infección del vPPA en las regiones del este de Europa.

Las **conclusiones** que se extraen de los resultados obtenidos en este trabajo son:

i) Los resultados obtenidos mediante el análisis de 350 animales procedentes de los países afectados del este de Europa, representativas del 18% de los focos y casos de la UE, revelaron la presencia de anticuerpos en el 50,9% de los animales analizados. De ellos, un 53,3% correspondió a jabalíes y 42,3% a cerdo doméstico. **ii)** El 27% de los jabalíes seropositivos, todos ellos procedentes de los casos ocurridos en el año 2015, resultaron negativos (o en el límite de detección) mediante la UPL-PCR, lo que representa el 14% del total de jabalíes analizados. Estos resultados indican que se está produciendo una evolución en la dinámica de la infección con un incremento en el número de animales supervivientes, que se caracterizan por presentar altos títulos de anticuerpos y baja o nula viremia. **iii)** Todos los aislados del este de Europa se clasifican dentro del genotipo II de la p72. Estos datos sugieren una única entrada del virus en Georgia en el 2007. **iv)** Mediante el análisis de la región central variable (RCV), se ha identificado una nueva variante del vPPA caracterizada por la delección de 12 aminoácidos asociada al caso de un jabalí que tuvo lugar en julio del 2015 en la región central de Estonia. **v)** El análisis de regiones alternativas del genoma del vPPA nos ha permitido identificar un nuevo marcador genético, la región intergénica entre los genes *I73R-I329L*, que clasifica los aislados circulando en el este de Europa en dos variantes genéticas. La variante GII-RIG2, presente en los virus de Ucrania y Bielorrusia secuenciados en esta tesis, es la responsable de los brotes en los países de la UE desde el 2014. **vi)** Los estudios de caracterización biológica con aislados del vPPA del genotipo II han demostrado que son aislados virulentos que inducen un patrón de infección típicamente agudo o hiperagudo con una mortalidad de entre el 94,5% y el 100%. **vii)** Los resultados obtenidos en el estudio de evaluación de las técnicas de diagnóstico de PPA mediante el análisis de 1274 muestras de campo y experimentales, han puesto de manifiesto que la UPL-PCR en combinación con la IPT, ofrecen los resultados más fiables para una detección temprana de la PPA en los países afectados de la UE. **viii)** En ausencia de suero, el análisis por IPT de muestras alternativas, como sangre o exudado de tejidos, resulta de gran utilidad para establecer la dinámica de la infección en función de la presencia o no de anticuerpos específicos frente al virus. Esto es especialmente relevante en el diagnóstico en jabalíes debido al elevado número de casos en los países de la UE.

SUMMARY

THE AFRICAN SWINE FEVER IN EASTERN EUROPE: The evolution of circulating isolates and the evaluation of diagnostic tools for monitoring the virus.

African swine fever (ASF) is a porcine disease with a complex viral etiology. It is infectious and contagious. No vaccine for ASF currently exists. Because of its economic importance and its impact on public health, ASF is on both the OIE and the European Union (EU) lists of diseases that are required to be disclosed. When ASF is detected, restrictions are immediately imposed on the commerce of pork and its derivatives.

ASF is caused by the African swine fever virus (ASFV), a large and structurally complex DNA virus. ASFV has a lipoprotein layer surrounding it. It is antigenically and genetically highly variable: 22 genotypes have been described to date. ASFV belongs to the family *Asfarviridae* and the genus *Asfivirus*, of which it is the sole species.

ASFV is found in 22 sub-Saharan African countries and the island of Sardinia, Italy. Since having been introduced into Georgia in 2007, it can also be found in the transcaucasian region, such as the center and south of the western area of the Russian Federation (RF). The epidemiological situation of ASF in Eastern Europe is complex. There are continuous outbreaks in the RF and other countries bordering the EU, such as Belorussia and Ukraine. This situation has ultimately led to the entry of the disease into various EU countries in 2014. These are Lithuania, Poland, Latvia, and Estonia. As of August 2015, more than 1000 notifications have been recorded in these countries, primarily for wild boars and to a lesser extent, domestic pigs.

Only species from the family *Suidae* and the soft-bodied ticks of the genus *Ornithodoros* are naturally infected with ASFV. The clinical signs of the disease are variable in domestic pigs and wild European boars. In contrast, wild African swine are resistant to infection: here, clinical courses are usually of the inapparent type.

The mortality and clinical signs of ASF depend on several factors including the type of host, dosage, route of exposure, and the virulence of the isolate. However, acute ASF is characterized by congestive and hemorrhagic lesions, whose course is generally fatal. The fatality of acute ASF is nearly 90% and even reaches 100%. Evolving patterns in endemic areas are showing an increase in the number of subacute, chronic, and subclinical types of ASF. Subacute types are caused by moderately virulent and virulent viruses. Chronic and subclinical types have case fatality rates that are below 20%. ASFV causes a persistent infection. As a consequence, animals that have survived and recovered from the infection are able to transmit the virus many months later. In this way, the disease is maintained in the swine population.

Since there is no ASF vaccine available, early detection in the field and reliable laboratory diagnoses are key elements, among others, for effectively monitoring the disease, avoiding its spread, and successfully establishing eradication programs. Laboratory diagnoses are paramount because of the similarity between the clinical signs of acute and subacute ASF and

those of other hemorrhagic diseases like the Classical Swine Fever, red skin, erysipelas, and even acute septicemic events or poisonings.

There are a wide range of techniques used to detect the virus and the specific antibodies. These diagnostic techniques are safe and robust for both infected and surviving animals. Of the commonly used methods for detecting the virus, the ones that stand out are the hemadsorption test, direct immunofluorescence, antigenic ELISA, and above all, PCR. PCR can be used to quickly and efficiently detect the viral genome in a wide range of samples.

Some of the most commonly used serological diagnostic techniques are ELISA (used as a screening method), Immunoblotting (IB), the indirect Immunoperoxidase test (IPT), and indirect Immunofluorescence. These are confirmatory tests that are employed whenever the ELISA results are either positive or inconclusive.

In order to work out how to trace an outbreak, molecular research based on the analysis of various regions of the ASFV genome is required. These include the regions found in the conventional genotyping, which was validated a decade ago. For example, the C-terminal end of the *B646L* gene can be used to differentiate and classify genetically diverse isolates according to the 22 known genotypes. The variable central region (CVR) of the *B602L* gene, which is rich in tandem repeats (TRs), can be employed to differentiate between closely related isolates. Also important is the *E183L* gene. In spite of all the information that is obtained analyzing these three regions, more information is occasionally required in order to be able to track the spread of a virus in a single area. Alternative regions have recently been reported: these are located in EcoRI region, which also contains TRs.

Objectives and Results:

In order to be able to effectively monitor the disease, it is crucial to understand the characteristics of the circulating isolates and the host infection. This information could be obtained by characterizing the isolates on a molecular level, by carrying out “*in vivo*” experiments with these isolates, and by carrying out epidemiological and diagnostic analyses. The tools for rapid diagnostic detection play an essential role. It is crucial to rely on rapid, sensitive, specific, and robust techniques, so that early detection can be achieved in various epidemiological settings. Therefore, the objectives of this doctorate thesis were: **a)** to characterize the circulating isolates of ASFV on a biological and molecular level and to study their epizootic progression in Eastern Europe, **b)** to evaluate the usefulness of available diagnostic tools in analyzing the outbreaks in Eastern Europe and their capacity for use with alternative samples. This was done by analyzing the course of ASFV infection in wild boars and domestic pigs in Eastern Europe.

663 field samples from 367 animals (284 wild boar and 83 domestic pigs) were analyzed. These arrived from Ukraine, Belorussia, Estonia, Latvia, Poland, and Lithuania between 2012 and 2015. The result of the analysis was that the genotype of ASFV was found in 94% of the animals

studied. This included all the domestic pigs and 92.2% of the wild boars. The virus was isolated from primary cultures of leukocytes and macrophages in 47 out of 57 domestic pigs and 57 out of 216 wild boars that had been studied. **All the isolates were hemadsorbent.**

Antibodies were detected in 178 out of 305 (50.9%) of the animals analyzed: 145 of these were wild boar (53.3 %) and 33 (42.3%) were domestic pigs. The latter had lower antibody titers. One result that should be underlined was that in 27% (39/145) of the seropositive wild boar, there was a weakly positive or negative PCR result.

The conventional **genotyping** was used to classify all the sequenced samples as genotype II of p72. There was a 100% homology between these analyzed samples and the ASFV isolates circulating in Eastern Europe, including the first isolate obtained in 2007 in Georgia. In addition, two new ASFV variants with differences in the CVR were detected. All but one the Eastern European viruses sequenced since 2007 were of the GII-CVR1 variant. This variant had a fragment of around 500 bp in length, with a sequence containing 10 copies of the amino acid tetramer BNDBNDBNAa. This fragment was characteristic of the African isolates obtained from the islands of Madagascar and Mozambique. It was also identical in sequence to the Georgian isolate from 2007. The GII-CVR2 variant had an amplicon less than 400 bp in length. It coded for 7 copies of tetramers in place of 10. To date (15th August, 2015), this second variant has been found in only one isolate extracted from the bone marrow of a wild boar infected in Estonia.

In order to make **epidemiological and phylogenetic links** between isolates that shared a high level of homology, 3 alternative regions located in the EcoRI-I fragment were assessed. The intergenic region located between the *I73R/I329L* genes was notable because it enabled the validation of differences between isolates circulating in Europe since 2007. The results showed that viruses originating from Ukraine, Belorussia, and EU countries contained an insertion of 10 nucleotides (GGAATATATA), which was lacking in the isolates from Georgia, Armenia, Azerbaijan, as well as those analyzed in the RF up until 2012. According with the literature, from then on, the two variants began to coexist in some areas of the RF

Experimental infections were carried out “*in vivo*” using the isolates Arm07 (Armenia), Ukr12/Zapo (Ukraine), and LT14/1490 (Lithuania). The purpose of these experiments was to determine the virulence, the clinical and pathological aspects of the infection, the immunological response unleashed in the host, and the parameters of transmission. Infection with Arm07 and LT14/1490 led to acute ASF, while infection with Ukr12/Zapo led to hyperacute ASF. The case fatality rate was 100% with Arm07 and Ukr12/Zapo and 94.5% with LT14/1490. With the latter, one of the animals with a proven infection remained asymptomatic throughout the experiment, up until it was sacrificed 61 days post-infection.

In the “*in vivo*” experiments with the Arm07 and LT14/1490 isolates, the animals had clinical signs associated with acute ASF. These appeared after a short incubation period. The animals died or were sacrificed 4±1 days after the clinical signs had appeared. In contrast, the animals

inoculated with the Ukr12/Zapo isolate had clinically varied symptoms. All died within 7 days of infection, save one, which died on day 10. In some cases, they died without ever having had any clinical symptoms.

Using the diagnostic tests, viremia was easily detected in all the animals. The virus could be isolated from all of them, with the exception of one asymptomatic animal. This animal showed a weak and intermittent viremia. The genome of ASFV was detected in only 9 of the 20 tissues analyzed. An antibody response was observed in a single animal in the experiment with Arm07 (16.6%). A response was observed with 6 animals in the experiment with LT14/1490 (33%).

Lesions that were reminiscent of the acute form of ASF were also observed in the necropsies. There were primarily general internal hemorrhages with splenomegaly, lymphadenitis, and hemorrhagic petechiae in the kidneys and lungs. These were even observed in the asymptomatic animal, which had hyperaemic splenomegaly, petechiae in the lungs, and hemorrhages in the lymph nodes.

In order **to evaluate diagnostic techniques**, three PCR different PCR methods were compared: UPL-PCR, conventional PCR, and the OIE recommended real time PCR assay. 785 field and experimental samples were studied. The agreement between the results of the UPL-PCR and the real-time PCR was nearly perfect, with κ values of 0.94 IC of 95% [0.91; 0.97]. Meanwhile, a κ value of 0.88 IC del 95% [0.83; 0.92] was calculated in the comparison between UPL- and conventional PCR. However, UPL-PCR was shown to be a more sensitive diagnostic method than conventional PCR for detecting carriers and could be used at earlier stages of infections. The results of the UPL-PCR and antigenic ELISA also coincided well, with a $\kappa = 0.67$ IC of 95%, [0.58; 0.76].

Three commercial ELISA kits were evaluated for their ability to detect antibodies specific for ASFV. Also evaluated were the OIE-indirect ELISA, , and the IPT. The sensitivity of the latter was higher than any of the ELISAS since it was able to detect specific antibodies at earlier stages of the infection (when the immunological response is just beginning and there are fewer antibodies). IPT was shown to be a very useful serological tool for detecting antibodies from **alternatives to sera**, like blood samples or tissue exudates. 90 exudates from 30 infected animals and 210 exudates from animals negative for ASF were analyzed by IPT. This technique was shown to have a sensitivity of 22.2%. The blocking ELISA (Ingenasa) had a somewhat higher sensitivity of 27.7%. However, the specificity of IPT was 100%, while only 84.3% for the commercial blocking ELISA. Because of their high sensitivity and specificity, IPT in conjunction with UPL-PCR were the ideal techniques for studying the dynamics of ASFV infection in Eastern European areas.

In light of the results, the following **conclusions** can be drawn:

i) 350 animals originating from affected Eastern European countries were analyzed. These represented 18% of the outbreaks and cases in the EU. The results showed that there were antibodies in 50.9% of the animals analyzed. Of these, 53.3% were wild boar, while 42.3% were

domestic pigs. **ii)** 27% of the seropositive wild boars, all of which were from cases from 2015, tested negative (or within the detection limit) with UPL-PCR. This was 14% of the total number of wild boars that were analyzed. These results indicated that the dynamics of infection were evolving: there was an increase in the number of surviving animals. These animals had high titers of antibodies and low or no viremia. **iii)** All the Eastern European isolates were classified as p72, genotype II. These data suggested that there was a single entry of the virus into Georgia in 2007. **iv)** The analysis of the central variable region (CVR), led to a new variant of ASFV being identified. This variant was characterized by a 12 aminoacid deletion. It was associated with the wild boar case of July 2015 in the central region of Estonia. **v)** The analysis of alternative regions of the ASFV genome led to the identification of a new genetic marker: the intergenic region between genes *I73R* and *I329L*. This marker was used to sort the isolates circulating in Europe into two genetic variants. The variant GII-RIG2 was found in the viruses of the Ukraine and Belarus. This variant was responsible for the outbreaks in countries of the EU in 2014. **vi)** The biological characterization of the ASFV genotype II isolates demonstrated that they were virulent isolates that had an infection pattern that is typically acute or hyper-acute with a mortality of between 94.5% and 100%. **vii)** The diagnostic techniques for ASF were evaluated using 1274 field and experimental samples. The results showed that UPL-PCR, in combination with IPT, gave the most robust results in the early detection of ASF in affected EU countries. **viii)** In the absence of serum, the analysis by IPT of alternative samples, such as blood and tissue exudate, was very useful for determining the infection dynamics as a function of the presence or absence of specific antibodies against the virus. This is especially relevant for the diagnosis of wild boars, since there are a high number of cases in these animals in EU countries.

INTRODUCCIÓN

Una tesis sobre Peste Porcina Africana, escrita en España en 1995 comienza con la siguiente frase “*En algunas zonas de éste y de otros países la sola mención de la enfermedad Peste Porcina Africana puede traer a la memoria recuerdos muy desagradables, cuando los sacrificios masivos de cerdos fueron el único remedio para la erradicación o el control de la enfermedad. Estos hechos supusieron la catástrofe económica de cientos de explotaciones en nuestro país y la paralización de un comercio de productos alimentarios derivados del porcino que, en aquellos momentos era de los más activos de nuestra economía.*”. Pues bien, el presente trabajo podría comenzar de manera similar.

Veinte años más tarde podemos hablar de importantes pérdidas económicas para la Unión Europea, eminentemente exportadora de productos porcinos, debido al cierre de fronteras por parte de algunos países como Rusia a raíz de la entrada del virus en los países del Este de la UE, Lituania, Polonia, Letonia y Estonia, hasta la fecha.

La Peste Porcina Africana (PPA) fue descrita por primera vez por Montgomery en Kenia, en 1921, cuando el virus se propagó desde los suidos silvestres africanos a los cerdos domésticos europeos recientemente introducidos en el país, causando entre ellos una mortalidad del 100% (Montgomery, 1921).

La PPA es una enfermedad de etiología vírica, muy compleja, de carácter infecto-contagiosa que únicamente afecta a los representantes del género *Sus*, tanto a los cerdos domésticos (*Sus scrofa domestica*) como a los jabalíes europeos y americanos (*Sus scrofa*) y para la que actualmente no existe vacuna (Sánchez Botija, 1963; Plowright y col., 1969).

La enfermedad se caracteriza, en sus formas agudas, por originar lesiones de carácter congestivo-hemorrágico de curso generalmente fatal, aunque el patrón de evolución de la PPA en zonas endémicas muestra un aumento de formas subagudas, causadas por virus virulentos y moderadamente virulentos y por la adaptación de virus al hospedador, pudiendo originar formas clínicas subagudas, crónicas y subclínicas, con tasas de letalidad mucho menores (Giammarioli y col., 2011). Estas formas clínicas adquieren gran importancia desde el punto de vista epidemiológico, ya que son las principales causantes de la aparición de portadores, animales recuperados de la infección y sin enfermedad aparente, capaces de transmitir el virus y por tanto de mantener enfermedad entre la población porcina (Sánchez-Botija, 1982; Wardley y col., 1983; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; Zaberezhnyi y col., 2012; Gallardo y col., 2015c).

Por su gran importancia económica y sanitaria está incluida dentro del grupo de enfermedades de declaración obligatoria de la lista de la OIE y de la Unión Europea. Su presencia conduce a restricciones inmediatas sobre el comercio de cerdo y productos derivados (EFSA, 2010; OIE, Código sanitario para los animales terrestres 2015).

1. EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA: ETIOLOGÍA.

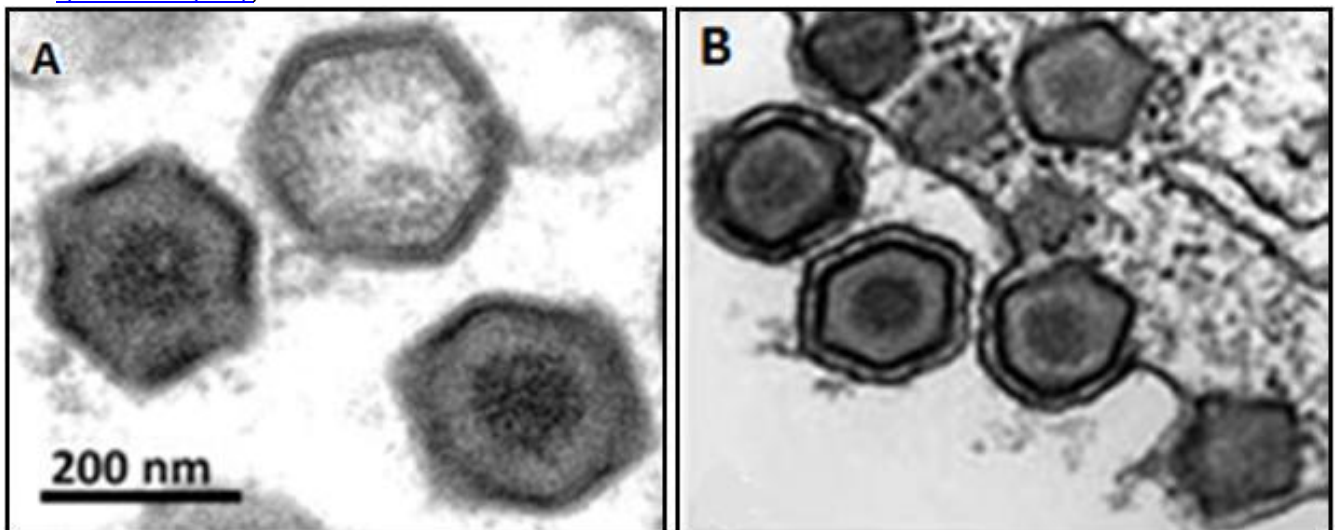
El agente etiológico causante de la PPA es un virus grande, de morfología icosaédrica y rodeado de una envoltura de naturaleza lipoprotéica, cuyo material genético es ADN.

Es el único Arbovirus conocido que posee ADN como material genético y es el único miembro de la familia *Asfarviridae* género *Asfivirus* (Dixon y col., Virus Taxonomy, 2000, 2005). Está incluido dentro de la superfamilia de grandes virus nucleocitoplasmáticos (NCLDV, por sus siglas en inglés) (Dixon y col., 2005; Iyer y col., 2006; Yutin y col., 2009).

Visto al microscopio electrónico las partículas virales extracelulares presentan un diámetro de unos 200nm (Breese y de Boer, 1966) y están compuestas de varias capas de envolturas concéntricas que rodean un nucleoide central de unos 70-100nm de diámetro con un modelo regular de fibras densas que sugieren la presencia de actina. Rodeando a la envuelta proteica del núcleo, encontramos una membrana lipídica y una cápside de morfología icosaédrica, similar a la que poseen los Iridovirus (Carrascosa y col., 1984).

El virus extracelular adquiere, además, una envuelta externa adicional a partir de la membrana de la célula hospedadora tras la exocitosis. Esta envuelta se ha comprobado que no es necesaria para mantener la infectividad ya que tanto los virus intra como extracelulares son infectivos, (Breese y De Boer, 1966; Breese y col., 1967; Carrascosa y col., 1984; Arzuza y col 1992).

Figura 1 → Micrografía del vPPA. **A)** Morfología del virión completo, aislado Ba71V (Rodríguez y col., 2009). **B)** Liberación del virus de una célula infectada (<http://vetmed.illinois.edu/researchers-identify-proteins-that-may-lead-to-vaccine-for-african-swine-fever/>).



1.1. Estructura del genoma.

El genoma del vPPA es una molécula de ADN lineal de doble cadena, de 170 a 193kb dependiendo del aislado, que contiene entre 151 y 167 fases de lectura abierta (ORFs), con genes implicados en multitud de funciones necesarias para su supervivencia, como la replicación y morfogénesis, actividades moduladoras o la evasión de la respuesta inmune del hospedador (Viñuela, 1987 Dixon y *col.*, 2005, 2013).

Al igual que en Poxvirus, los extremos se encuentran unidos covalentemente, con la presencia de repeticiones invertidas y uniones finales en horquilla de 37 nucleótidos, compuestos casi en su totalidad por residuos de adenina y timina no emparejados (Ortín y *col.*, 1979; Almendral y *col.*, 1984; Sogo y *col.*, 1984; Viñuela, 1987).

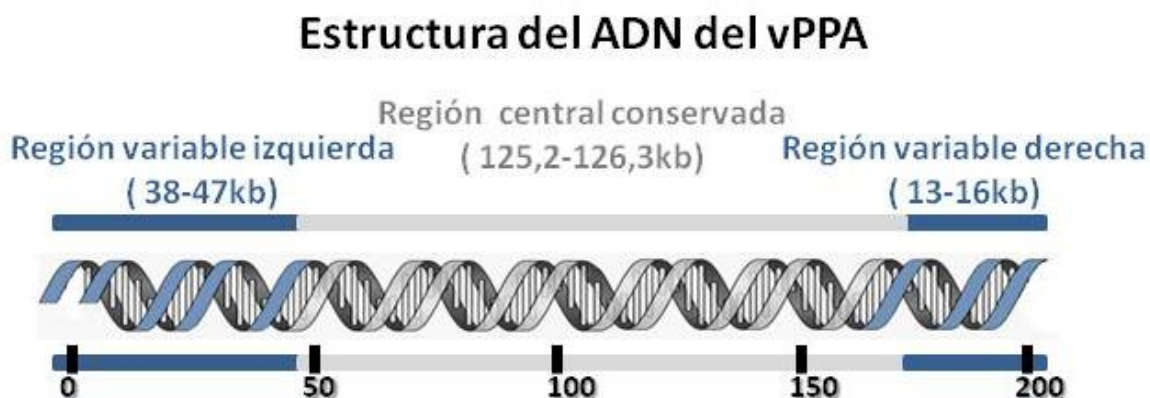
Las repeticiones invertidas de los extremos del ADN están constituidas por varias series de repeticiones directas dispuestas en tándem y separadas por zonas de secuencia única. Su longitud es variable, ya que depende del número de copias de las repeticiones en tándem (Blasco y *col.*, 1989).

Adyacentes a éstas, hacia el interior del genoma, se encuentran unas series de repeticiones directas que dan lugar a cinco familias multigénicas que poseen genes que codifican para proteínas ligeramente distintas pero muy relacionadas (González y *col.*, 1990 y Almendral y *col.*, 1990, Yañez y *col.*, 1995). Las mayores diferencias en longitud entre los distintos aislados están asociados a la pérdida o ganancia de copias dentro de estas familias (Dixon y *col.*, 2013).

A través de análisis con enzimas de restricción se han podido definir tres regiones en el ADN viral: una región central, relativamente constante y de unas 125-126 Kb y dos regiones variables, situadas en los extremos de la molécula.

Es en estas dos regiones variables donde se producen mayoritariamente los cambios entre aislados, que pueden llegar a suponer hasta un 10% de la longitud total del genoma (Blasco y *col.*, 1989) (**figura 2**).

Figura 2 → Representación esquemática de la estructura del genoma del vPPA.



Además de la variabilidad encontrada en los extremos, Dixon y *col.* (1990) describieron tres regiones variables situadas dentro de la región central conservada (RCC) caracterizadas por la presencia de secuencias de nucleótidos repetidos en tándem (SRT).

Estas SRT se sitúan en loci tanto dentro de secuencias codificantes como en regiones intergénicas y también otorgan variabilidad al genoma del vPPA por variaciones en el número de repeticiones de estas unidades y no a la secuencia repetida en sí (Dixon y *col.*, 1990; Lubisi y *col.*, 2007).

Estas tres regiones son:

- El gen *EP402R*, implicado en el fenómeno de la hemoadsorción y situado a 48kb del extremo izquierdo del genoma del vPPA (Rodríguez y *col.*, 1993a).
- La región central variable (RCV), localizada a unos 90kb de dicho extremo izquierdo (Irusta y *col.*, 1996).
- Una región más amplia, situada entre 12 y 22kb del extremo derecho y que a su vez incluye varias regiones variables:
 - * Gen *E183L*, que codifica para la proteína p54 del vPPA (Nix y *col.*, 2006, Gallardo y *col.*, 2009a, c).
 - * Fragmento EcoRI-I, Presenta una longitud total de 6004 pb y dentro de él se han descrito varias regiones ricas en secuencias SRT: las regiones intergénicas *I73R-I329L* e *I78R-I215L* y el gen *I196L* (Rodríguez y *col.*, 1992b).

En la actualidad 15 aislados han sido secuenciados en su totalidad: el primero fue el aislado avirulento Ba71VR (Badajoz 71 adaptado a células Vero) (Yañez y *col.*, 1995; acceso del GeneBank NC001659) en el que se identificaron 160 ORFs, que codifican la expresión de más de 150 proteínas, de las que 50 son estructurales y muchas, altamente inmunogénicas (Alcaraz y *col.*, 1989).

Años más tarde se analizaron los genomas completos de otros aislados virulentos clasificados también dentro del genotipo I de la p72: E75 (España75) (de Villiers y *col.*, 2010 acceso del GeneBank FN557520) y L60 (Lisboa) (Portugal y *col.*, 2015 acceso del GeneBank KM262844 y el aislado NH/P68, también del genotipo I, pero de baja virulencia (Portugal y *col.*, 2015 acceso del GeneBank KM262845).

En la bibliografía también podemos encontrar información acerca de otros 11 aislados de los que también se ha publicado el genoma completo: Benin97/1 (Chapman y *col.*, 2008, acceso del GeneBank AM712239); Kenia 1950 (Zsak y *col.*, 2005, acceso del GeneBank AY261360) Malawi Lil/20/1, (Haresnape y Wilkinson 1989, acceso del GeneBank AY261361); Mkuzi 1979 (Zsak y *col.*, 2005, acceso del GeneBank AY261362); OURT 88/3 (Boinas y *col.*, 2004; acceso del GeneBank AM712240), Pretorisuskop/96/4 (Zsak y *col.*, 2005, acceso del GeneBank AY261363); Tengani62 (Pan 1992, acceso del GeneBank AY261364); Warthog (Zsak y *col.*, 2005 acceso del GeneBank AY261366), Warmbaths (Zsak y *col.*, 2005, acceso del GeneBank AY261365), Georgia2007/1

(Chapman y *col.*, 2011 acceso del GeneBank FR682468), Ken06.Bus (Bishop y *col.*, 2015 acceso del GeneBank KM111295), Ken05/Tk1 (Bishop y *col.*, 2015 acceso del GeneBank KM111294, Bishop y *col.*, 2015) y Odintsovo 02/14 (sin verificar, acceso del GeneBank KP843857, Shevchenko y *col.*, 2015 sin publicar).

Para cada uno de los aislados mencionados anteriormente existe un número variable de genes, que oscila entre 167 en los aislados de Warmbath, Pretorisuskop-96-4 y Mkuzi 1979 hasta sólo 156 en el aislado de Benin97 (Chapman y *col.*, 2008; de Villiers y *col.*, 2010).

1.2. Genes del vPPA: proteínas para las que codifican.

1.2.1. Proteínas implicadas en la replicación.

El virus infecta naturalmente a células del sistema inmune, siendo sus principales dianas las células del sistema mononuclear fagocitario (SMF), fundamentalmente los monocitos macrófagos (Enjuanes y *col.*, 1976; Wardley y Wilkinson, 1977; Casal y *col.*, 1984).

Aunque tradicionalmente se ha considerado que la vía de entrada del virus en las células tiene lugar mediante un mecanismo de endocitosis mediada por receptores, estudios llevados a cabo en los últimos años han postulado que la entrada el virus se lleva a cabo mediante macropinocitosis dependientes de actina pero independiente de receptores (Valdeira y Geraldles, 1985; Alcamí y *col.*, 1989, 1990, 1992; Valdeira y *col.*, 1998; Carrascosa y *col.*, 1999; Sánchez y *col.*, 2012). Una vez internalizados los viriones comienza la replicación y a pesar de la controversia que existe acerca de cómo y dónde tiene lugar, la hipótesis más aceptada hoy es la de la replicación citoplasmática en las factorías virales, a pesar de que la síntesis nuclear está demostrada (Breese y de Boer, 1966; Ortín y Viñuela, 1977; Tabarés y Sánchez-Botija, 1979; Pan y *col.*, 1980; Rojo y *col.*, 1999; Ballester y *col.*, 2011).

Como ya hemos dicho anteriormente, el vPPA posee toda la información necesaria para sintetizar las enzimas implicadas en la replicación, transcripción y reparación del ADN viral y para la síntesis y modificación de los ARN generados, por lo que la transcripción el genoma se produce independientemente de la ARN polimerasa de la célula huésped (Yañez y *col.*, 1995; Dixon y *col.*, 2013). Una vez que el virus es internalizado por la célula hospedadora, los genes que codifican para las enzimas necesarias en la replicación del ADN empiezan a expresarse de forma inmediata. Las primeras en actuar son una ARN polimerasa ADN-dependiente, capaz de sintetizar el ARN complementario a partir del ADN viral y las enzimas necesarias para la síntesis de ARN mensajeros tempranos (Viñuela 1985; Salas y *col.*, 1986). Éstas se continuarán sintetizando hasta que la ADN polimerasa viral comience a replicar el ADN, momento que marca el principio de la transcripción tardía, durante la que se sintetizan tanto los mensajeros como las proteínas tardías (Escribano y Tabarés, 1987; Rodríguez y *col.*, 1993b, 1996). Una vez sintetizadas, el ensamblaje en las partículas virales maduras se realiza en las factorías citoplasmáticas en las que el ADN viral condensado se

inserta en una partícula "vacía" para producir los viriones maduros (Brookes y *col.*, 1998; Dixon y *col.*, 2013).

1.2.2. Proteínas estructurales y proteínas utilizadas en el diagnóstico.

De los 17 genes del vPPA que codifican para proteínas estructurales y para aquellas necesarias en el ensamblaje de la partícula viral, al menos seis son codificadas por dos genes, el *CP2475L* y el *CP530R*. Cada uno sintetiza una poliproteína precursora que sufrirá un procesamiento proteolítico para dar lugar a las proteínas finales (Simón-Mateo y *col.*, 1993, 1997; Dixon y *col.* 2013).

Otros, codifican directamente para proteínas estructurales (Alcamí y *col.*, 1992 y Camacho y Viñuela, 1991). Entre ellos destacan los genes *E183L* y *B646L* que codifican para la p54 y la p72 respectivamente (Carrascosa y *col.*, 1985; López-Otin y *col.*, 1990; Rodríguez y *col.*, 1994). Ambas muy inmunogénicas y muy utilizadas en el diagnóstico del vPPA (Oviedo y *col.*, 1997; Gómez-Puertas y *col.*, 1998, Tabarés y *col.*, 1980a).

La p72 debido a su alto grado de conservación y a su elevada inmunogenicidad se utiliza tanto en el diagnóstico serológico y virológico como en la clasificación de los aislados del vPPA en uno de los 22 grupos establecidos por Boshoff y *col.* en 2007 mediante el análisis del extremo C-terminal del gen *B646L* (Arias y *col.*, 1993; Agüero y *col.*, 2003; King y *col.*, 2003; Fernández-Pinero y *col.*, 2013). Por otra parte, la p54 además de ser empleada en el diagnóstico serológico se ha revelado de gran utilidad en la subclasificación de aislados (Gallardo y *col.*, 2009a, b; 2011a,c).

Otra proteína muy inmunogénica, en la que también se han basado técnicas serológicas para el diagnóstico de la PPA es la p30, codificada por el gen *CP204L* a tiempos muy tempranos de la infección y que, al contrario que las anteriores, no aparece asociada a microsomas, orgánulos celulares o factorías virales sino soluble en el citosol, colaborando en la internalización del virus (Alcaraz y *col.*, 1992; Prados y *col.*, 1993; Oviedo y *col.*, 1997; Gómez-Puertas y *col.*, 1998; Pérez-Filgueira y *col.*, 2006; Rowlands y *col.*, 2008). Debido a la variabilidad que esta proteína presenta entre los distintos aislados, también se ha empleado como marcador molecular en el subtipado de aislados relacionados (Rowlands y *col.*, en 2008).

1.2.3. Proteínas moduladoras.

El vPPA induce proteínas que modulan o interfieren en la respuesta inmune innata y adaptativa del hospedador frente a la infección, siendo esta modulación uno de los mecanismos más eficaces que utiliza el virus para evadir los sistemas de defensa del hospedador. Se han descrito algunas vías de actuación, entre las que destacamos:

- I. **La disminución de la capacidad de adhesión de los linfocitos T y las natural killer (NK)** a los monocitos y macrófagos infectados, mediante la síntesis del producto del gen *EP402R* (pEP402R), responsable de la adhesión de eritrocitos a la membrana de las células

infectadas en cultivo (hemoadsorción) (Rodríguez y *col.*, 1993a; Ruiz-Gonzalvo y *col.*, 1993; Dixon y *col.*, 2004).

- II. **La modulación de la apoptosis de células infectadas, pudiendo prolongar así la supervivencia de la célula y favoreciendo la replicación del virus** (Brun y *col.*, 1996; Revilla y *col.*, 1997; Nogal y *col.*, 2001; Galindo y *col.*, 2008; Neilan y *col.*, 1993). El vPPA presenta varios genes que pueden llevar a cabo los procesos de inhibición o modulación de la apoptosis a través de varias, rutas entre los que se encuentran:
 - a. El gen *A179*, regulador negativo de la apoptosis y homólogo viral de *Bcl-2* (Dixon y *col.*, 2013).
 - b. El gen *A224L*, inhibidor de la apoptosis (Nogal y *col.*, 2001; Dixon y *col.*, 2013).
 - c. El gen *EP153R* (Galindo y *col.*, 2000; Hurtado y *col.*, 2011; Dixon y *col.*, 2013).
 - d. El *A238L*, que puede modular la apoptosis, activándola o inhibiéndola a distintos tiempos post-infección (Granja y *col.*, 2006a, b; Silk, 2007; Salguero y *col.*, 2008; Sánchez y *col.*, 2012; Dixon y *col.*, 2004, 2013).

1.3. Inmunidad e infección.

La gran complejidad estructural del virus, con su elevado número de proteínas sintetizadas durante la infección e inducidas en la célula del hospedador, el desconocimiento de los mecanismos inmunológicos que median la protección frente a la infección y la ausencia de anticuerpos neutralizantes, en el clásico concepto de “neutralización”, constituyen verdaderos desafíos en los que se continúa trabajando para desentrañar el efecto que el vPPA tiene sobre el sistema inmune del hospedador.

El vPPA infecta células de linaje mieloide, fundamentalmente los macrófagos, monocitos y células dendríticas, siendo los CD44+ la subpoblación de macrófagos más susceptibles a la infección (Malmquist y Hay, 1960; Enjuanes y *col.*, 1976; Wardley y Wilkinson, 1977; Casal y *col.*, 1984; McCullough y *col.*, 1993). Todas ellas son células presentadoras de antígenos (CPA) por lo que su infección por el vPPA compromete tanto su capacidad fagocítica y quimiotáctica como su capacidad para presentar antígenos provocando alteraciones tanto en la respuesta inmune como en la humoral (Takamatsu y *col.*, 2013).

Se ha observado la capacidad del vPPA de infectar células endoteliales, hepatocitos y neutrófilos, aunque en menor medida (Gómez-Villamandos y *col.*, 1995 Carrasco y *col.*, 1996a). Por otra parte y aunque la infección por el vPPA provoca linfopenia (disminución en el número de linfocitos) no está demostrada su capacidad de infectar ni linfocitos T ni B, por lo que la disminución tanto en el número de linfocitos B, como en número y en funcionalidad de los linfocitos T, está asociada principalmente a la apoptosis inducida por la infección (Wardley y Wilkinson, 1980; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 1981; Gómez-Villamandos y *col.*, 1995; Ramiro-Ibáñez y *col.*, 1996; Oura y *col.*, 1998b; Salguero y *col.*, 2004, Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

Cuando el vPPA infecta un organismo, se desencadenan respuestas de tipo humoral y celular en el hospedador a través de las CPA, que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos e inician la respuesta inmune por varias vías: activación de los linfocitos T y T efectores, secreción de citoquinas y quimioquinas, eliminación de patógenos mediante fagocitosis y activación de la respuesta humoral mediante la estimulación de los linfocitos B y producción de anticuerpos, que persistirán durante largos períodos de tiempo (Neilan y *col.*, 2004). Una de las características más importantes del vPPA es que, a pesar de que activa la producción de anticuerpos, sólo un pequeño porcentaje de ellos son neutralizantes y aunque éstos no neutralicen completamente la infección viral pueden provocar un retraso en la aparición de los síntomas clínicos (Gómez-Puertas y *col.*, 1996; Neilan y *col.*, 2004). La respuesta mediada por anticuerpos ofrece un cierto grado de protección tal y como demostraron Onisk y *col.* en 1994 y Schlafer y *col.* 1984 a través de la transferencia pasiva de anticuerpos mediante suero de cerdos inmunes o calostro, que provocó el retraso en la aparición de los síntomas clínicos y reducción de la viremia en infecciones con aislados virulentos, aunque no protegieron a los animales de una eventual muerte. Zsak y *col.* (1993) comprobaron que el suero de cerdos recuperados de una infección por el aislado atenuado E75CV4-4 (aislado español E75 adaptado a células CV) era capaz de neutralizar “*in vitro*” entre un 86 y 97% la infectividad de aislados virulentos, como E75, L60 o Malawi Lil 20/1, así como el propio aislado E75 adaptado a cultivo celular con un bajo número de pases, pero curiosamente no neutralizaban virus adaptados a cultivo celular con un alto número de pases, lo que podría indicar cambios críticos en los determinantes antigénicos al adaptarse a estos cultivos, cambios ampliamente demostrados por diversos autores, entre los que podemos encontrar, entre otros, a Zsak y *col.* (1993); Escribano y *col.* (2013); Krug y *col.* (2014) o a Portugal y *col.* (2015).

Aunque la comunidad científica está de acuerdo al destacar la importancia de la inmunidad celular en la infección por el vPPA y en la protección del hospedador, los estudios son complejos y existen limitaciones importantes entre las que destacan la necesidad de experimentación “*in vivo*” sobre el propio hospedador real (el cerdo doméstico o jabalí), por la imposibilidad de utilizar pequeños animales como modelos de infección, tales como ratones, o roedores y la obvia necesidad de supervivencia de los animales en los ensayos de inmunidad (Revilla y *col.*, 1994; Takamatsu y *col.*, 1999; Argilaguet y *col.*, 2011). Todo ello hace que las infecciones más habituales para estos estudios se hayan realizado con aislados de moderada o baja virulencia que presentan una patogenicidad e inducción a la inmunidad no homogénea (Leitão y *col.*, 2001; Takamatsu y *col.*, 2013). A pesar de todo ello, hay multitud de estudios descritos que ayudan en el conocimiento de la respuesta celular que se genera ante el vPPA. A través de ellos, podemos saber que aislados moderadamente virulentos inducen la proliferación de linfocitos T de memoria frente a virus homólogos o que en macrófagos de animales previamente recuperados de una infección por un aislado no virulento, la infección con aislados inactivados inducen una proliferación igualitaria de linfocitos CD4+ y linfocitos CD8+, mientras que la infección con aislados virulentos inducen la proliferación mayoritaria de CD8+ (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 1981; Canals y *col.* 1992).

También se conoce que en la infección por el vPPA cobran especial importancia tanto los linfocitos T CD8+ como las células natural killer (NK). Los primeros, porque su inactivación anula la protección generada por la cepa no virulenta OURT T88/3 frente al homólogo virulento OURT T88/1 y las segundas, porque actúan directamente eliminando las células infectadas por virus o produciendo citoquinas (como el IFN γ) y quimioquinas (Leitão y *col.*, 2001; Oura y *col.*, 2005).

En 2001 Leitão y *col.*, demostraron “*in vivo*” una hipótesis que se había postulado “*in vitro*” años antes: que la actividad de células NK se estimula “*in vitro*” por el virus atenuado NH/P68, pero era inhibida por el aislado virulento Lisboa 60 (L60): se comprobó que existía una correlación entre el aumento de mecanismos de citotoxicidad mediada por células NK y la ausencia de síntomas clínicos en cerdos inoculados con el aislado no virulento NH/P68, frente a la presencia de síntomas típicos de un cuadro crónico de PPA en animales con menor actividad de las NK. Al desafiar estos animales con L60 (homólogo virulento), los animales que permanecieron asintomáticos en la primera inoculación resistieron el desafío (Martins y Leitão en 1994).

En relación con la resistencia generada por la inoculación con aislados no virulentos otro punto importante en la inmunidad celular, con vistas al desarrollo de una posible vacuna, es el interferón, producido principalmente por linfocitos T activados y células NK. En 1988 Esparza y *col.* comprobaron “*in vitro*” que el IFN γ reducía la replicación del vPPA en macrófagos porcinos, pero no fue hasta 2011 cuando King y *col.* establecieron “*in vivo*” una correlación entre la presencia de altos niveles de IFN γ y protección frente a la letalidad de un aislado virulento.

Por tanto, vista la importancia que cada uno de los componentes del sistema inmune juega en la protección frente al vPPA, un candidato efectivo debería inducir la producción de anticuerpos con capacidad neutralizante e inducir respuestas específicas de tipo celular T CD8+ (Gallardo y *col.*, 2009b; Dixon *col.*, 2013; Takamatsu y *col.*, 2013).

2. EPIDEMIOLOGÍA y EVOLUCIÓN.

2.1. Historia.

La difusión y distribución de la PPA en el mundo a través del tiempo ha pasado por varias etapas principales: desde la primera descripción, hecha por Montgomery en 1921 en Kenia (1921), atravesó una etapa de confinamiento en África que terminó con los dos primeros saltos internacionales producidos en 1957 y 1960 y que derivaron en la primera gran expansión fuera del continente Africano. Entre los años 1960 y 1995 la PPA se extendió por los continentes europeo y americano (zona del Caribe), de donde fue prácticamente, erradicada a excepción de la isla de Cerdeña.

Pasados 35 años, una vez declarada la Península Ibérica zona libre (en Diciembre de 1995), el virus sufrió una nueva etapa de acantonamiento y expansión en África que desembocó, en 2007, en

un nuevo salto intercontinental, origen de la situación actual: tercera incursión del virus en Europa desde la zona del Cáucaso, donde ocurrió el brote inicial.

2.1.1. Hasta 2007, en África, Europa, Sudamérica y Caribe.

Los primeros brotes de la enfermedad se detectaron en Kenia en 1907, aunque ésta no fue descrita por vez primera hasta 1921 (Montgomery, 1921).

Durante las siguientes décadas se mantuvo el continente africano en continua expansión, alcanzando Sudáfrica en 1928, Angola (1932) y la zona central del continente, para extenderse al oeste de África en 1959 (Penrith y Vosloo, 2009).

Esta dinámica se mantendrá incluso fuera del continente africano ya que el año 1957 el vPPA se descubre por primera vez en Lisboa, introducido probablemente a través de carne contaminada procedente de Angola. Este foco fue controlado rápidamente pero en 1960 se volvieron a declarar nuevos brotes en Portugal, en la misma zona de Lisboa, extendiéndose esta vez no sólo por todo el país, sino a toda la Península Ibérica, donde permaneció endémica durante más de 30 años (Manso-Ribeiro y col., 1961; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002). Aunque hubo cierta controversia acerca del origen del segundo brote producido en Lisboa, resultados moleculares de ambos aislados, sugirieron dos introducciones distintas (Gallardo y col., 2009a, b).

En ese mismo año (1960) la PPA se detecta en España, primero en pequeñas explotaciones familiares de la frontera con Portugal y posteriormente en toda la Península en la que se mantuvo de forma enzoótica hasta 1995 cuando se declaró oficialmente libre de la enfermedad. En 1999 la PPA resurgió en la región del Alentejo (Portugal), debido a la presencia de garrapatas del género *Ornithodoros erraticus*, pero fue rápidamente eliminada (Boinas y col., 2011).

Desde la Península Ibérica, la PPA se extendió hacia Europa: en Francia apareció por primera vez en 1964 siendo erradicada diez años después y en Italia se detectó por primera vez en 1967. En 1977 y 1978, la enfermedad fue descubierta en las islas de Malta y Cerdeña mientras que durante los años 1985 y 1986 se declararon brotes en Bélgica y Holanda respectivamente. De todos estos países, a excepción de la isla de Cerdeña, donde aún hoy permanece endémica, la enfermedad fue rápidamente erradicada (Giammarioli y col., 2011, Sánchez-Vizcaíno y col., 2013b).

En el año 1971 se produjo otro salto intercontinental pero en esta ocasión el origen fue la Península Ibérica y su destino, Cuba y posteriormente Brasil, República Dominicana (1978) y Haití en 1979. En estos países la enfermedad no tardó en erradicarse mediante sacrificios masivos, sobre todo en las islas (Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a; Costard y col., 2013a, b).

Mientras el virus se extendía por el continente europeo, en África ocurría algo parecido: a partir de 1994 la PPA vivió su época de máxima expansión afectando a países como Costa de Marfil, Gambia, Senegal, Benin, Togo, Nigeria (1997) o Ghana (1999) y a otros que habían permanecido libres de la enfermedad hasta entonces como Burkina Faso (2003), Chad (2010), islas de

Madagascar(1998) y Mauricio (2007) o incluso en Mauritania en ese mismo año (Penrith y *col.*, 2004a; Lubisi y *col.*, 2009; Owolodun y *col.*, 2010).

Esta enorme expansión puede explicarse por una serie de factores entre los que destacan el aumento de la producción porcina, la presencia de cerdos sin sintomatología aparente (portadores) y la globalización que, junto con la crisis económica actual, ha empujado a los pequeños agricultores a fórmulas alternativas de alimentación del ganado mediante residuos o subproductos cárnicos que podrían ser, de forma directa o indirecta, el origen de la propagación del virus de la PPA a Europa del Este (Penrith y Vosloo, 2009; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2012b).

Si a estos factores añadimos la resistencia del virus tanto en el medio ambiente como en los productos alimenticios, especialmente en carnes frescas (sobrevive 1.000 días en la carne congelada) o sometidas a tratamientos tecnológicos de baja intensidad y productos derivados (embutidos), la probabilidad de que se produjese un nuevo salto intercontinental era manifiesta. Este finalmente ocurrió en abril de 2007 con la entrada de la PPA en Georgia (Costard y *col.*, 2009; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2012b).

2.1.2. 2007-2014: la PPA en el Cáucaso y Este de Europa.

En junio de 2007 se confirmó la presencia del vPPA en la región del Cáucaso en Georgia (OIE: 5720; junio 2007). Se ha sugerido que el brote comenzó en abril de 2007, cerca del Puerto de Poti en el Mar Negro, probablemente debido al empleo de carnes contaminadas procedente de los buques internacionales como alimento para el ganado porcino (Beltrán-Alcrudo y *col.*, 2008).

Aunque la entrada del virus en Georgia se produjo en abril del 2007, no fue hasta junio de ese mismo año cuando se declaró a la OIE (OIE: 5720; junio 2007). Debido a este retraso en la confirmación y a pesar de los intentos por frenar la propagación de la enfermedad mediante el sacrificio masivo de cerdos, el 9 de Julio de ese mismo año el brote ya se había extendido a 56 de los 61 distritos de Georgia lo que provocó que más de 80.000 cerdos murieran o fueran sacrificados. El 29 de agosto de 2007 la enfermedad se confirma en Armenia y el 4 de noviembre en la región colindante de Nagorno-Karabaj, una república independiente pero oficialmente parte de Azerbaiyán y cercana a la frontera con Armenia y a Irán (Gallardo y *col.*, 2009c; Rahimi y *col.*, 2010). El 4 de diciembre de este mismo año, se confirma la infección de un jabalí en la república rusa de Chechenia, cerca de la frontera con Georgia y en enero de 2008 fue declarado el primer brote de PPA en Nidj (distrito de Quebele, Azerbaiyán), extendiéndose rápidamente entre la población de cerdo doméstico de la Federación Rusa (FR) (Gallardo y *col.*, 2009c; ver **figura 3**).

Figura 3 → Mapa de la expansión de la PPA en la zona del Cáucaso durante los años 2007 y 2008.



La propagación del virus a las regiones del sureste de la FR originó finalmente su difusión a otros países fronterizos, como Ucrania (OIE: 12168 julio 2012) y Bielorrusia (OIE: 13663; junio 2013), dejando las zonas limítrofes de la Unión Europea en una situación de alto riesgo de introducción del vPPA (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2013b; Gogin y *col.*, 2013).

Estudios epidemiológicos confirmaron posteriormente que esta oleada de brotes en el este de Europa se produjo a raíz de una única introducción puntual de un aislado de vPPA del genotipo II, estrechamente relacionado con los aislados que circulan en Mozambique, Madagascar y Zambia desde el Este de África (Rowlands y *col.*, 2008; Gallardo y *col.*, 2009c).

En Rusia, desde el primer brote hasta la fecha se han producido más de 510 notificaciones, que han afectado tanto a cerdo doméstico como a jabalíes y cerdos asilvestrados y han ido avanzando cronológicamente, en dirección sur-norte (Balyshv y *col.*, 2010; Gulenkin y *col.*, 2011).

Durante el año 2007 la PPA permaneció restringida a las poblaciones de jabalíes, pero en junio del 2008 se declaró el primer brote en cerdo doméstico, presumiblemente por contacto con jabalíes infectados, en la República de Osetia del Norte (color verde claro en la **figura 4a**), extendiéndose durante ese año por varias de las regiones que componen el Distrito Federal del Cáucaso Norte de la FR (Oganesyan y *col.*, 2013). Es en los años 2009 y 2010 cuando la PPA empieza su ascenso real hacia el norte de la Federación Rusa aunque limitándose, de momento, al Distrito Federal Sur, con algún brote esporádico en el Distrito Federal Noroeste en la región de Leningrado, cerca de la ciudad de San Petersburgo y Distrito Federal del Volga en la región de Oremburgo (Malogolovkin y *col.*, 2012; Oganesyan y *col.*, 2013) (**figura 4a**).

Estas regiones, afectadas durante años, han dado lugar al establecimiento de una zona endémica que agrupa el Distrito Federal del Cáucaso Norte y el Distrito Federal Sur (Oganesyan y *col.*, 2013; Gogin y *col.*, 2013).

Figura 4a → Mapa de las localizaciones en las que se produjeron las notificaciones de PPA en la FR entre los años 2007 y 2010: Notificaciones PPA en negro •. Distrito Federal del Cáucaso Norte (●), con la República de Osetia del Norte señalizada en verde claro (●); Distrito Federal Sur (●); Región de Leningrado (●), Distrito Federal Noroeste y Región de Oremburgo (●), Distrito Federal del Volga. Cortesía del grupo de Epidemiología y Sanidad animal del INIA-CISA. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE.



En el año 2011 la situación se complica aún más y la PPA comienza su expansión: hacia el centro de la FR, siguiendo el curso del río Volga hacia el norte en la región del Tver, cercana a Moscú y hacia la parte europea de Rusia, con más brotes en el distrito de Leningrado limítrofe con Estonia y en el distrito de Kursk limítrofe con Ucrania. Además se siguen produciendo notificaciones de forma esporádica en localidades muy alejadas del origen, en la península de Kola, (distrito de Múrmansk, a las orillas del mar de Barents), o en la desembocadura de río Dvina, en el distrito de Arcangel, ambos dentro del Distrito Federal Noroeste (color azul en la figura 4b).

Esta situación se mantuvo durante el año 2012 registrándose multitud de brotes en las regiones de Krasnodar y Tver (Distrito Federal Centro y Sur, en rojo y amarillo respectivamente en la figura 4b), llegándose a definir esta última como una nueva zona endémica (Oganesyan y col., 2013).

Durante la segunda mitad del 2013 se registró un elevado número de notificaciones fuera de las zonas consideradas endémicas, marcando así una tendencia difusa de expansión que se mantendrá durante el año 2014 y hasta la actualidad (agosto 2015), con multitud de declaraciones en los distritos de Moscú y Tver y en las provincias limítrofes con las fronteras ucraniana y bielorrusa, todas en el Distrito Federal Central (rojo en la figura 4b) a las que posteriormente se añadirán las regiones colindantes con Estonia y Letonia en el Distrito Federal Noroeste (azul en la figura 4b),

manteniéndose afectadas las regiones de Krasnodar (Distrito Federal Sur, en amarillo en la figura 4b) y diversas poblaciones a las orillas del río Volga, dentro del Distrito Federal del Volga (en morado e la figura 4b).

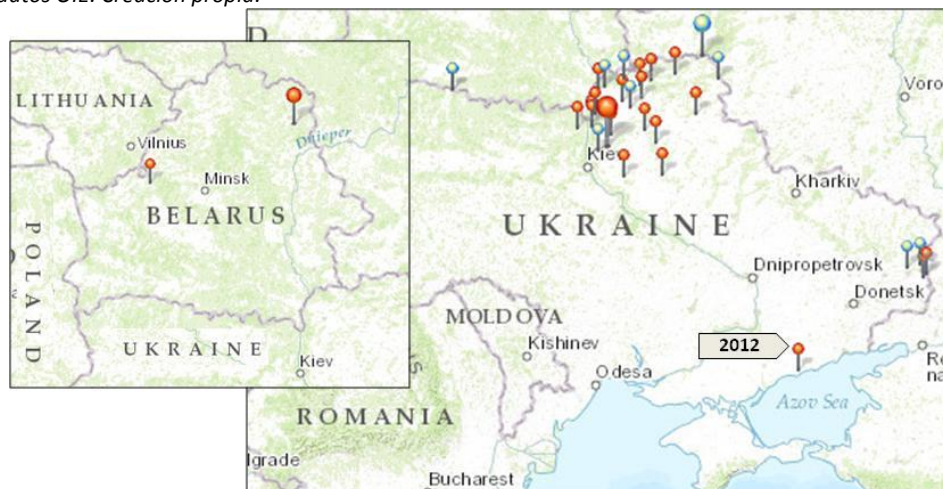
Figura 4b → Mapa de las localizaciones en las que se produjeron las notificaciones de PPA en la FR entre los años 2007 y 2015: Notificaciones PPA en negro •. Regiones afectadas del Distrito Federal Noroeste (•); Regiones afectadas del Distrito Federal Central (•); Regiones afectadas del Distrito Federal del Volga (•); Distrito Federal Sur (•) y Distrito Federal del Cáucaso Norte (•). Cortesía del grupo de Epidemiología y Sanidad animal del INIA-CISA. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE.



Esta situación, junto con los brotes producidos en 2012, 2013 y 2014 en las vecinas Ucrania (OIE: 12168; julio 2012; OIE: 14625; enero 2014) y Bielorrusia (OIE: 13663; junio 2013), supuso una situación de gran amenaza para los países de la UE, principalmente por el comercio ilegal de productor cárnicos contaminados y por la presencia de corredores ecológicos de jabalíes que conectan estas zonas de riesgo con Polonia, Lituania o Rumania.

La situación de Ucrania y Bielorrusia ha sido prácticamente desconocida durante estos últimos años ya que, aunque Ucrania ha declarado un total de 31 notificaciones (10 en jabalí y 21 en cerdo doméstico) desde agosto de 2014 (**figura 5**), Bielorrusia sólo declaró dos focos aislados en 2013, en las provincias de Grodno, fronteriza con Polonia y Vitebsk que comparte frontera con Rusia, aunque parece muy probable que el virus permanezca en el país (EFSA, 2014) (**Figura 5**).

Figura 5 → Mapa con los brotes declarados en Bielorrusia y Ucrania entre los años 2012 y 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.



Este descontrol y arraigo de la enfermedad ha estado provocada, entre otros, por una falta de control de la fauna silvestre y, en gran medida, por las numerosas explotaciones de ganadería tradicional de traspato, muy extendidas entre la población de estas áreas del este de Europa y caracterizadas por bajas medidas de bioseguridad, el libre pastoreo que permite el contacto entre animales silvestres y domésticos y la alimentación de los animales con restos de comida (EFSA, 2010; Beltrán-Alcrudo y col., 2009; Sánchez-Vizcaíno y col., 2012b; Gogin y col., 2013; Oganessian y col., 2013). Además, a todos estos factores habría que añadir el gran volumen de transporte ilegal de cerdos y de productos cárnicos, asociado a la introducción de la enfermedad en zonas libres, la falta de servicios veterinarios en algunas zonas y de infraestructura de la producción porcina (Gulenkin y col., 2011; Oganessian y col., 2013).

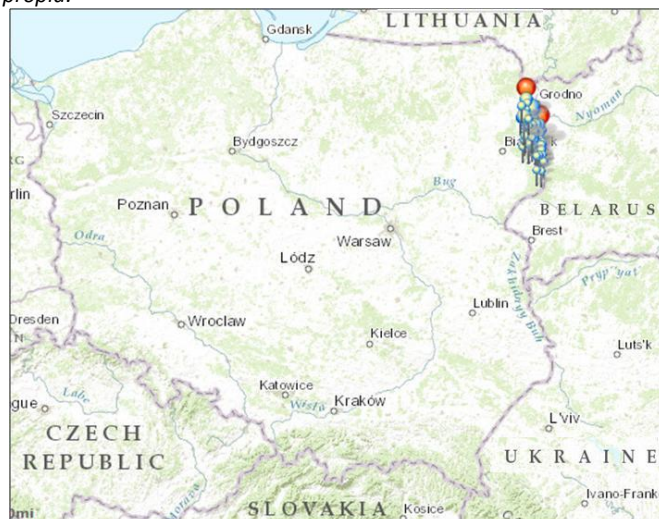
Algunos expertos incluso achacan al gobierno federal ruso la falta de interés en erradicar la PPA, que se traduce en la ausencia de una legislación federal y regional en relación a la PPA, programas nacionales de vigilancia (no existía hasta principios de 2014 una vigilancia serológica) o un programa de control gubernamental coordinado que implicara a todos los sectores afectados, productores, cazadores y veterinarios, focalizado tanto en el reconocimiento de la enfermedad en el campo como en la concienciación de los riesgos asociados a la cría tradicional (Sánchez-Vizcaíno y col., 2012b, 2015; Gogin y col., 2013; EFSA, 2014; Mur y col., 2014b; Vergne y col., 2014). Asimismo, se echan en falta cambios en las infraestructuras de la producción porcina y sobre todo, recursos financieros que respalden estas medidas y compensen económicamente a los ganaderos por los animales sacrificados. Esta situación en Rusia, junto con el preocupante desconocimiento de lo que ocurría en las vecinas Bielorrusia y Ucrania, originó la entrada de la PPA en la Unión Europea.

2.1.3. 2014 - 2015: entrada y expansión de la PPA en la UE.

En Enero de 2014 se confirmaron los peores pronósticos y llegaron las primeras notificaciones de Peste Porcina Africana en territorio de la Unión Europea. Durante los primeros meses de 2014 se declararon los primeros casos en Lituania y Polonia en áreas colindantes con Bielorrusia. El primer caso declarado dentro de la UE tuvo lugar en Lituania, el 24 de enero de 2014, cuando las autoridades lituanas notificaron la presencia del vPPA en dos jabalíes encontrados muertos cerca de la frontera con Bielorrusia, en los distritos de Vilna (en Salcininkai a 5 kilómetros de la frontera) y Alytus (en Varena, a 40 kilómetros de la frontera).

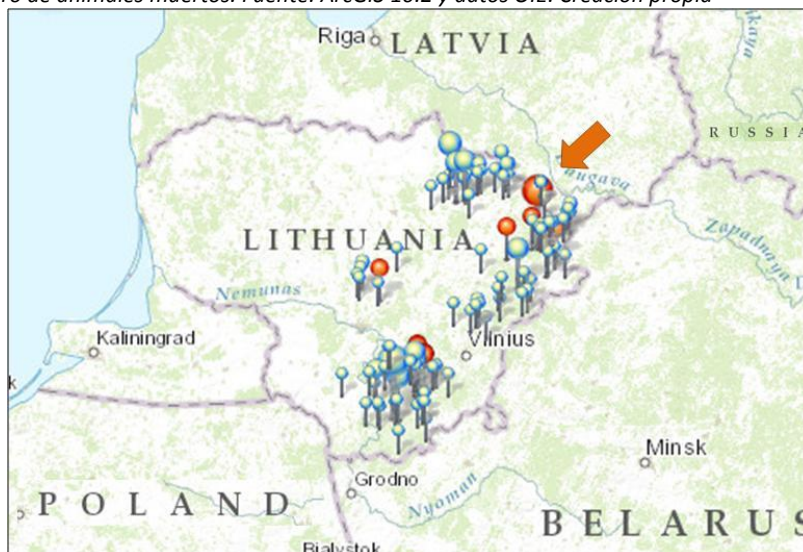
Casi un mes más tarde, el 17 de febrero, se informó de los dos primeros casos ocurridos en Polonia, también en jabalíes y también cerca de la frontera con Bielorrusia, a 900 metros en uno de ellos y a tan sólo 200 metros en el otro, ambos en la Provincia de Podlaskie. Este episodio se cerró rápidamente (apenas un mes después) pero pocos meses más tarde se notificaron nuevos focos, todos en la provincia de Podlaskie, sometida a las medidas de restricción apropiadas relativas a la Peste Porcina Africana establecidas de acuerdo con la Decisión de la Comisión 2014/178/UE (hoy derogada por la Decisión de Ejecución de la Comisión de 9 de octubre de 2014 (2014/709/UE) (**figura 6**).

Figura 6 → Mapa con los brotes declarados en Polonia entre febrero de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.



Ambos países han seguido declarando focos durante todo el año 2014 y hasta el 15 de agosto de 2015 tanto en fauna silvestre como en cerdos doméstico: en Polonia se declararon un total de 80 notificaciones, de las que 77 afectaron a jabalíes y 3 a cerdo doméstico y en Lituania, se han declarado 103 casos en jabalí y 13 brotes en cerdo doméstico, entre los que cabe destacar el declarado el 24 de julio en una explotación de intensivo situada en el distrito de Ignalina en la región de Utena, en el que casi 20000 animales tuvieron que ser sacrificados (**figura 7**).

Figura 7 → Mapa con los brotes declarados en Lituania entre enero de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. Marcado con una flecha roja, el brote declarado en Ignalina. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia



Al igual que en Polonia, la mayoría de los brotes ocurridos se han localizado cerca de zonas fronterizas, principalmente en la frontera que comparte con Bielorrusia, en los condados de Utena, Vilna y Alytus, aunque en el caso de Lituania un porcentaje muy significativo de las notificaciones se ha localizado en el condado de Panevezys situado al norte del país, cercano a la frontera con Letonia y puntualmente se han declarado brotes esporádicos en el centro del país, en el condado de Kaunas.

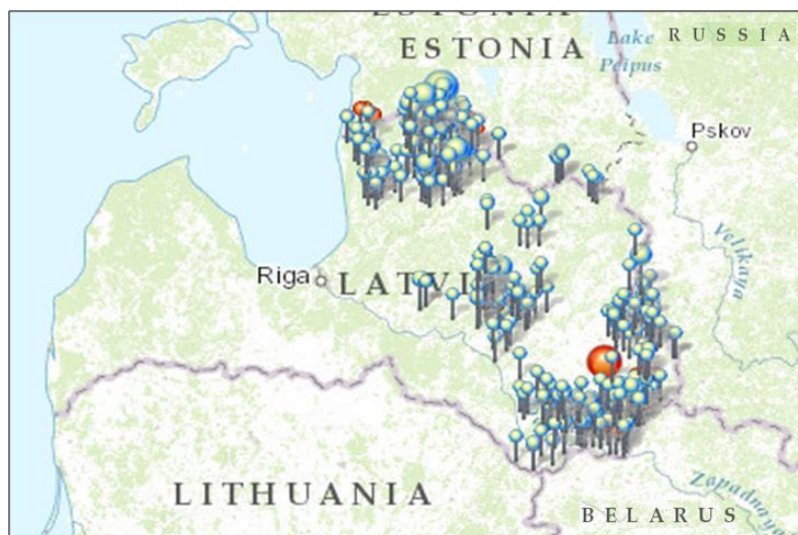
Los resultados epidemiológicos apuntan a que es el movimiento de jabalíes infectados la vía de entrada más probable en ambos países (Gallardo y col. 2014a).

En Junio de 2014 Letonia sufrió el primer brote del vPPA dentro de sus fronteras y desde entonces más de 540 notificaciones han sido realizadas a la OIE, fundamentalmente en jabalíes (506), aunque también han aparecido brotes en cerdos domésticos (39), asociados en un principio a la ganadería familiar de traspatio, muy arraigada en este país (Sánchez-Vizcaíno y col., 2012b). Aún hoy no se disponen de suficientes datos epidemiológicos para determinar cuál fue la vía exacta de entrada del virus pero se barajan dos opciones como posible origen de la infección: por una parte los jabalíes que transitan entre ambas fronteras parece el origen más factible del foco de Dagdas en jabalí, mientras que el comercio y/o transporte de productos cárnicos contaminados parece el origen del foco declarado en Kraslavas, en cerdo doméstico. Asimismo, éste comercio parece que ha influido de manera determinante en la rápida expansión del virus a lo largo del país: sólo un mes tardó en desplazarse desde el sur del país (distritos de Kraslavas y Dagas) al norte, a la frontera con Estonia, en el distrito de Valkas quedando establecido en dos zonas: la frontera con Bielorrusia en el sur y la frontera con Estonia en el norte.

Entre agosto y septiembre se añadieron nuevas zonas infectadas: la región central y la frontera con la Federación Rusa y a finales de ese mismo año nuevos brotes acercaron el virus a la frontera con Estonia y al golfo de Riga.

Finalmente, durante el año 2015 quedó conformado el mapa que podemos ver en la **figura 8**, en el que aparecen como zonas infectadas: el noroeste del país, fronterizo con Estonia (con brotes más o menos esporádicos a lo largo de toda la frontera), la zona centro, perteneciente al condado de Madona y la frontera oriental y sur-oriental, que comparte con la Federación Rusa y Bielorrusia respectivamente, pudiéndose ver un avance general de la enfermedad de este a oeste.

Figura 8 → Mapa con los brotes declarados en Letonia entre junio de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.

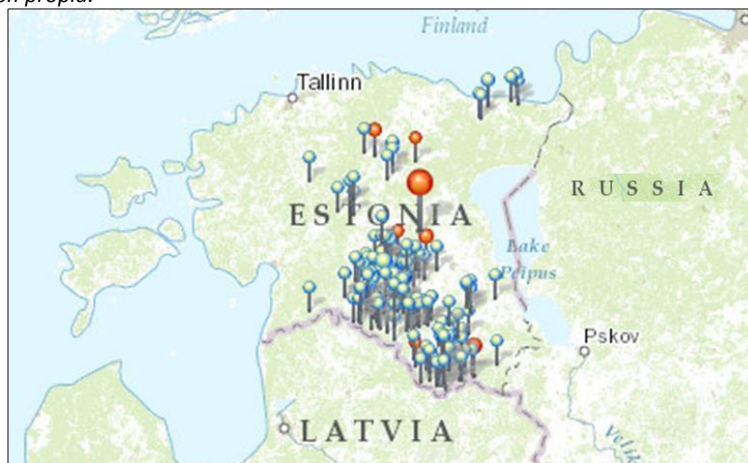


En septiembre de este mismo año se produjo el primer brote en Estonia, el último país europeo hasta la fecha en comunicar la enfermedad. Concretamente se detectó en un jabalí encontrado muerto en la frontera con Letonia, en el distrito de Valga fronterizo con la región de Valka (Letonia) por lo que podría estar relacionado con los brotes ocurridos en esta región.

Desde entonces se han declarado un total de 183 casos en jabalí, distribuidos en tres zonas geográficas: en el sur del país, en los condados de Valga y Voru (que comparten frontera con Letonia y Rusia) en el centro (primero en el condado de Viljandi, posteriormente en Tartu con algún brote Jarva, ya en el centro-norte) y en el norte, en el condado de Ida-Viru, cercano a la frontera con Rusia, pudiendo apreciarse un avance en dirección sur-norte, con la salvedad de los brotes de Ida-Viru, cercanos a la frontera rusa.

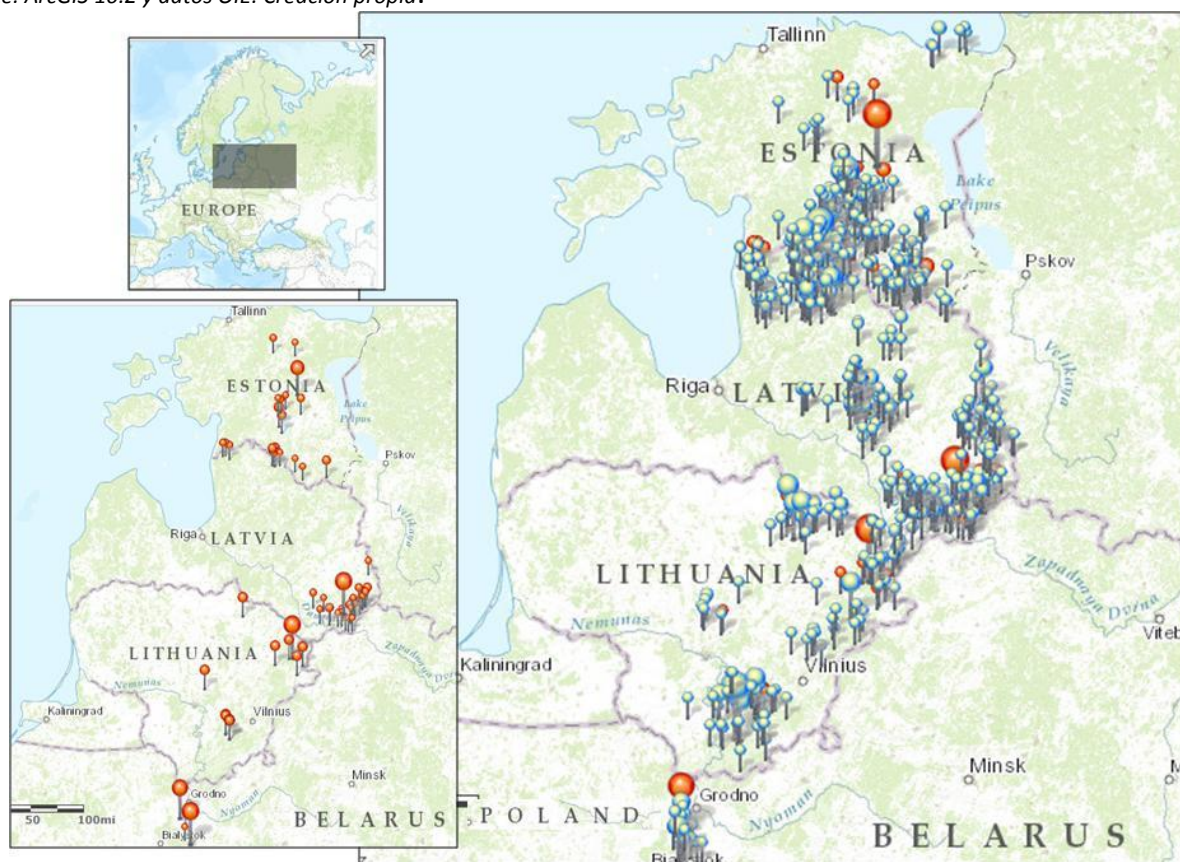
Hasta el verano de 2015 las únicas notificaciones declaradas afectaron a jabalí, pero el 17 de julio se declaró el primer brote en cerdo doméstico en una granja familiar en el distrito de Valga, al sur del país. Desde entonces se han declarado 11 brotes más, siguiendo la línea longitudinal de casos ocurridos en jabalí, tal y como se aprecia en la **figura 9**.

Figura 9 → Mapa con los brotes declarados en Estonia entre septiembre de 2014 y agosto 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.



En resumen, desde enero de 2014 hasta el 15 de agosto de 2015 en todo el territorio de la UE se han realizado 936 notificaciones de los que el 92,8% corresponden a casos en jabalí y el 7,2% a brotes en cerdo doméstico, como aparece representada en la **figura 10**

Figura 10 → Mapa con las notificaciones declaradas a la OIE dentro del territorio de la UE entre enero de 2014 y agosto de 2015. En azul casos en jabalí y en rojo brotes en cerdo doméstico. La dimensión de los símbolos es proporcional al número de animales muertos. Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.



En todos los países se han implementado las medidas de restricción y control marcadas por la Unión Europea (Directiva del Consejo 2002/60/CE), de acuerdo con la Decisión de Ejecución (UE) 2015/1405 de la Comisión del 18 de Agosto de 2015 y la Decisión de Ejecución (UE) 2015/1432 de la Comisión de 25 de agosto de 2015 que modifican “el anexo de la Decisión de Ejecución 2014/709/UE, sobre medidas de control zoonos sanitarias relativas a la Peste Porcina Africana en determinados Estados miembros, en lo que respecta a las entradas correspondientes a Letonia y a Estonia y Lituania respectivamente”.

A nivel molecular todos los aislados descritos desde la entrada de la PPA en Georgia en 2007 pertenecen al mismo genotipo II, clúster en el que también se incluyen los aislados de Mozambique, Madeira y Zambia (Malogolovkin y *col.*, 2012; Gallardo y *col.*, 2014a).

En relación a la epidemiología de la enfermedad algunos investigadores defienden que no se han detectado cambios ni en el patrón patológico ni en patrón epidemiológico de la PPA típicamente aguda y aunque no se han encontrado animales recuperados, lo que apoyaría esta idea, no es posible excluir su existencia al menos hasta 2014, ya que no es posible detectar animales portadores asintomáticos mediante inspección clínica y en la Federación Rusa no ha existido vigilancia activa basada en el diagnóstico serológico hasta principios de 2014 (Belyanin y *col.*, 2011; Gabriel y *col.*, 2011; Blome y *col.*, 2012, 2013; Gogin y *col.*, 2013; Guinat y *col.*, 2014; Mur y *col.*, 2014b).

De hecho, durante los años 2014 y 2015 se ha comenzado a publicar los resultados de los análisis serológicos realizados a muestras experimentales y de campo y se ha comprobado que existe un porcentaje de animales que sobrevive el tiempo necesario para empezar a generar anticuerpos y que alguno de ellos puede, incluso sobrevivir durante más de un mes, considerando los títulos de anticuerpos que presentan (Kurinnov y *col.*, 2014; Mur y *col.*, 2014b; Vlasova y *col.*, 2014; Gallardo y *col.*, 2014 a, b; 2015a,b). Además se ha registrado, en determinadas regiones de la FR y de la UE, un porcentaje significativo de jabalíes seropositivos con resultados negativos en PCR en sangre (Kurinnov y *col.*, 2014, Gallardo y *col.*, 2015a). Así, en un estudio realizado en 2013 sobre un total de 1694 muestras de jabalí recogidas en la región de Smolensk, en la frontera con Bielorrusia, se vio que el 21% de los jabalíes positivos, (7% del total analizados) dieron un resultado negativo a PCR pero positivo anticuerpos (Kurinnov y *col.*, 2014).

Estos datos, apuntan que sin duda a la posibilidad de que algunos animales puedan recuperarse de la infección o permanecer infectados de forma subclínica (Mur y *col.*, 2014b; Gallardo y *col.*, 2014a, 2015a, c).

2.2. Hospedadores.

El virus de la PPA es capaz de infectar todas las especies de la familia *Suidae*, aunque la susceptibilidad de los diferentes hospedadores varía enormemente (Montgomery, 1921; 1921a; Polo Jover y Sánchez-Botija, 1961; De Tray, 1963; Heuschele y Coggins, 1965). Mientras los *suidos*

silvestres africanos son resistentes, pudiendo desarrollar infecciones de tipo subclínico e inaparente, los jabalíes europeos y americanos sí son susceptibles, con síntomas clínicos y mortalidad similar a la observada en cerdos domésticos (Pérez y col. 1998; Penrith y col., 2004b, 2013; EFSA, 2010; Jori y Bastos, 2009; Penrith y Vosloo, 2009; Jori y col., 2013; Costard y col., 2013b; Blome y col., 2013; Gogin y col., 2013).

El vPPA también es capaz de replicar en las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*, que actúan como vectores biológicos y junto con los suidos silvestres africanos, constituyen un verdadero reservorio del virus (de Tray, 1957, Sánchez-Botija, 1982; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; Gallardo y col., 2009a; Jori y col., 2013; Sánchez-Vizcaíno y col., 2015).

Aunque experimentalmente también se ha conseguido infectar otros animales, como la cabra o el conejo, el cerdo es la única especie doméstica infectada naturalmente por el vPPA (Polo Jover 1966; OIE, 2015a).

Estudios realizados en Mozambique han mostrado presencia del vPPA en cerdos domésticos con un alto título de anticuerpos, mientras que otros revelan claramente una baja incidencia de animales seropositivos infectados con vPPA en los países de África oriental, como Kenia y Uganda (Penrith y col., 2004b). Estas diferencias epidemiológicas suscitaron gran preocupación en torno a la posibilidad de un problema en la sensibilidad en las técnicas serológicas aunque también se barajó la posibilidad de que pudieran existir animales resistentes o tolerantes a la enfermedad.

En relación a la primera cuestión y con el fin de obtener información sobre la posible falta de sensibilidad de las técnicas serológicas recomendadas por la OIE, el EURL realizó un estudio de gran envergadura para evaluar la adecuación de estas técnicas, basadas en aislados pertenecientes al genotipo I, al análisis de muestras obtenidas de animales infectados con aislados pertenecientes a otros genotipos. El estudio se realizó utilizando 1496 muestras de campo y experimentales y demostró que la sensibilidad y la especificidad de las técnicas prescritas por la OIE es independiente del genotipo con el que hubiera sido infectado el animal (Gallardo y col., 2013).

Las dudas respecto a la segunda cuestión no desaparecieron al realizar infecciones experimentales en estos cerdos domésticos potencialmente tolerantes ya que están descritas dos situaciones opuestas: mientras que algunos autores afirman que los representantes de razas africanas presentaron unas tasas de mortandad similares a las de los cerdos europeos, un estudio comparativo entre razas europeas (Landrace) y razas indígenas domésticas del este de África mostró que existe un mayor porcentaje de supervivencia, ausencia de sintomatología clínica externa, retraso en la aparición de anticuerpos y en general un retraso en la evolución de la enfermedad en estos cerdos indígenas, que desarrollan un curso típico de una infección subclínica, frente al curso agudo sufrido por las razas europeas ante la infección con el mismo virus circulante en la región (Penrith y col., 2004b). Estos resultados sugirieron en primera instancia que la posible relación genética de estos animales indígenas con el jabalí africano del género *Potamochoerus larvatus*, presente en esas latitudes y con menor susceptibilidad a la infección del vPPA podría ser la

causa de esta tolerancia, aunque finalmente este hecho no se ha confirmado, ya que se ha comprobado que el cerdo indígena del este de África posee mayor relación genética con el cerdo doméstico europeo (Cañón y col., 2015).

Dentro de la fauna silvestre es donde se ha determinado una mayor diversidad en cuanto a la susceptibilidad a la infección, al padecimiento de los síntomas clínicos y también y estrechamente relacionado con lo anteriormente dicho, el papel de cada hospedador silvestre en la epidemiología de la PPA.

Englobado por el concepto de “suidos africanos” podemos encontrar tres géneros bien diferenciados entre sí: los facóqueros (género *Phacochoerus*), los potamóqueros (género *Potamochoerus*) y los hilóqueros (género *Hylochoerus*), todos ellos resistentes a la enfermedad y con infecciones subclínicas o inaparentes, lo que los convierte en portadores y reservorios del virus (Montgomery, 1921; De Tray, 1963; Heuschele y Coggins, 1965; Anderson y col., 1998).

Los facóqueros (género *Phacochoerus*) se encuentran ampliamente distribuidos por África meridional y se consideran los hospedadores originales del virus, así como los más importantes en el mantenimiento de la PPA (Jori y Bastos, 2009). Sus infecciones se caracterizan por una viremia leve e intermitente, aunque se ha conseguido aislar el virus de los nódulos linfáticos, insuficiente para presentar sintomatología pero no como para que los jóvenes jabalíes puedan transmitir el virus a través de las garrapatas del género *Ornithodoros*, estableciéndose así un ciclo de infecciones jabalí-garrapata conocido como ciclo selvático (Penrith y col., 2004b; Jori y Bastos, 2009). Por otra parte sí presentan seroconversión y de hecho hay datos que afirman que un elevado porcentaje de la población de facóqueros de Kenia, Tanzania y Uganda presenta anticuerpos frente al vPPA (Penrith y col., 2004b; Plowright y col., 1969, 1994).

Los potamóqueros del género *Potamochoerus* (*P. larvatus* y *P. porcus*) aparecen distribuidos en el Sureste de África los primeros y en el Oeste y centro los segundos. Son considerados de menor importancia que los anteriores en la epidemiología de la PPA por estar presentes en menor número, presentar tasas de infección más bajas y tener menor contacto con el cerdo doméstico que los anteriores, al menos en Sudáfrica. Además, este género de suidos silvestres no frecuenta las madrigueras, por lo que al no compartir ese espacio con las garrapatas blandas se elimina la posibilidad de un ciclo de infección-reinfección similar al que ocurre entre *Ornithodoros* y los jabalíes del género *Phacochoerus* (Wilkinson y col., 1988; Roger y col., 2001 Costard y col., 2009).

La infección en éstos animales está caracterizada por la usencia de síntomas clínicos, tasas de anticuerpos indetectables y bajos niveles de viremia, suficientemente altos para infectar al cerdo doméstico pero no como para infectar otros individuos de su mismo género, lo que sugiere que presentan una menor sensibilidad a la infección por el vPPA (Anderson y col., 1998; Roger y col., 2001; Jori y col., 2013).

Por último, los hilóqueros, pertenecientes al género *Hylochoerus*, se localizan en las montañas del centro de África, son los menos determinantes en la epidemiología de la PPA, ya que por su carácter altamente territorial y su escaso contacto con el cerdo doméstico es improbable que influyan en su transmisión del virus a la población doméstica (Jori y Bastos, 2009).

2.2.1. Vectores biológicos.

El vPPA es capaz de infectar garrapatas blandas del género *Ornithodoros* y mantenerse en un ciclo de infecciones-reinfecciones entre suidos (cerdos y/o jabalíes) y garrapatas, lo que favorece la endemidad de la enfermedad en las zonas en las que ambos comparten hábitat (este de África o en la Península Ibérica) haciendo muy difícil su erradicación (Sánchez-Botija, 1963; Oleaga-Pérez y col., 1990; Pérez-Sánchez y col., 1994; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002). La dificultad radica en que el virus no sólo es capaz de replicar en ellas sino que además puede permanecer vivo e infectivo en su interior durante largos períodos de tiempo, llegando incluso a los cinco años (Sánchez-Botija, 1963; Kleiboeker y Scoles, 2001; Boinas y col., 2011).

Las garrapatas adquieren el virus cuando se alimentan con la sangre de cerdos infectados con el vPPA y transmiten la enfermedad mediante picadura cuando hacen una nueva toma de sangre para alimentarse. Cuando el virus entra en la garrapata, replica en el tracto intestinal y de ahí pasa a las glándulas salivares y órganos sexuales.

Todas las especies del género *Ornithodoros* estudiadas hasta el momento son susceptibles de ser infectadas, al menos experimentalmente y varias especies pertenecientes a este género han demostrado ser capaces de transmitir el vPPA (EFSA, 2010).

En el continente africano (África oriental y meridional), *O. moubata* contribuye a la persistencia del vPPA a través del ciclo selvático (Plowright y col., 1969; Haresnape y Mamu, 1986). Esta especie puede transmitir el virus de forma transovárica, transtadial y sexual (Plowright y col., 1994; Rennie y col., 2001; EFSA, 2010).

En la península Ibérica, *O. erraticus* que dificultó enormemente las tareas de eliminación de la enfermedad en las zonas donde compartían territorio con la población de cerdos, sólo puede transmitir el virus de forma transtadial y sexual de machos a hembras (Caiado y col., 1988; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; EFSA, 2010).

En el Cáucaso y Europa Central encontramos multitud de especies pertenecientes al género *Ornithodoros*: *O. alactagalis*, *O. asperus*; *O. erraticus*; *O. lahorensis*; *O. tholozani* y *O. verrucosus* (EFSA, 2010). Aunque se ha demostrado la capacidad de algunas de estas especies para transmitir el vPPA y Díaz y col. en 2012 demostraron experimentalmente la capacidad del aislado Georgia 2007/1 de replicar en *O. erraticus*, aún se desconoce el papel de estas garrapatas en la transmisión del virus en el este de Europa ya que, por una parte, los estudios realizados hasta el momento no han confirmado su papel en la epizootia actual y por otra, estos chinchorros no suelen compartir las

madrigueras con los jabalíes como ocurre en el caso de *O. moubata* y los facóqueros (Beltrán-Alcrudo, 2008; Jori y Bastos 2009; Gogin y col., 2013; Sánchez-Vizcaíno y col., 2015).

Se han realizado diversos estudios para analizar la existencia de otros posibles vectores mecánicos dentro de los invertebrados que se alimentan de sangre. Estos estudios han descartado el papel como posibles vectores de varias especies de garrapatas duras del género de los ixódidos: *Ixodes ricinus*, *Dermacentor reticulatus*, *Rhipicephalus* spp. e *Hyalomma* spp. entre otros ya que demostraron que el virus no era capaz de replicar en estos artrópodos, lo que apoya la hipótesis de que sólo las garrapatas blandas son capaces de transmitir el vPPA (Sánchez-Botija, 1963; EFSA, 2010; de Carvalho Ferreira y col., 2014).

2.2.2. Papel del jabalí europeo (*Sus scrofa*).

Al contrario de lo que ocurre con los jabalíes africanos, los jabalíes silvestres que encontramos en el continente Euroasiático presentan las mismas manifestaciones clínicas y porcentajes de mortandad similares a los del cerdo doméstico, tanto en infecciones naturales como experimentales, como ha quedado patente en numerosos estudios realizados con diversos aislados (McVicar y col., 1981; Pérez y col. 1998; Gabriel y col., 2011; Jori y Bastos, 2009; EFSA, 2010; Blome y col., 2013; Gogin y col., 2013; Pietschmann y col., 2015). Al igual que ocurre con los cerdos domésticos, aislados de distinta virulencia inducen el desarrollo de distintos síntomas clínicos (Pérez y col., 1998).

De acuerdo con su taxonomía existen dos grupos de suidos silvestres en el continente Euroasiático, los cerdos asilvestrados y los jabalíes, aunque ambos pertenecen a la misma especie: *Sus scrofa* siendo ésta una de las especies de mamíferos más ampliamente distribuida en el continente.

El jabalí europeo está implicado, junto con los cerdos asilvestrados, los criados en semilibertad y las garrapatas blandas (si comparten hábitat con ellos) en el mantenimiento de la enfermedad en el ciclo salvaje. En este ciclo las infecciones en cerdos domésticos se pueden producir siempre que exista el contacto entre el cerdo y cualquiera de los integrantes del ciclo, situación que ocurre principalmente en zonas con ganadería extensiva o familiar, con la importancia que esto tiene tanto para la diseminación de la enfermedad hacia zonas libres como para su mantenimiento en las especies silvestres por reinfecciones continuadas. Las infecciones se pueden producir a través del contacto directo entre animales o por la ingesta de canales contaminadas (Beltrán – Alcrudo, 2008; Jori y Bastos, 2009; EFSA, 2010; Gabriel y col., 2011; Gogin y col., 2013; de la Torre y col., 2013; Iglesias y col., 2014; Pietschmann y col., 2015; Sánchez-Vizcaíno y col., 2015).

En el caso de los jabalíes europeos que habitan en Europa central y en la región del Cáucaso, la infección a través de garrapatas no se ha demostrado puesto que, aunque se sabe que existen garrapatas blandas en estas dos zonas, el hecho de que los jabalíes no tengan un lugar fijo para

descansar hace que no compartan madrigueras con estos argásidos (EFSA 2010; Zaberezhnyi y *col.*, 2012; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

La importancia de los jabalíes en el mantenimiento y dispersión de la enfermedad radica en múltiples factores, entre los que cabe destacar:

- La existencia de corredores que mantienen en contacto las poblaciones de jabalíes desde la Federación Rusa hasta Centroeuropa. En concreto Bielorrusia aparece conectada tanto con Polonia como con Lituania y los corredores que comienzan en Ucrania conectan la población de jabalíes de este país con las de Polonia y Rumanía y en menor medida con las de la república de Eslovaquia y Hungría (EFSA, 2010).
- La elevada densidad de jabalíes existentes en las áreas fronterizas de los países miembros del este de la UE con países no-UE, que aumenta progresivamente y alcanza una densidad especialmente elevada en Centroeuropa y las grandes superficies que presentan estas fronteras (EFSA 2010; de la Torre y *col.*, 2013).
- El papel del jabalí como portador del virus.
- La dificultad de eliminar el virus una vez se ha establecido en la vida silvestre, derivada de las complicaciones que presenta el control de estas poblaciones silvestres.

Si a estos factores añadimos que el número de casos se ha ido hasta llegar a los casi 1000 declarados durante los años 2014 y 2015 (hasta 15 agosto), podemos clasificar sin duda al jabalí como uno de los puntos clave en el control eficaz de la enfermedad, sobre todo teniendo en cuenta que, aunque en la FR el papel del jabalí en la dispersión del virus es menor que el del cerdo doméstico, en los países de la UE afectados ocurre todo lo contrario (Iglesias y *col.*, 2014). De hecho, de los 940 casos declarados entre los años 2014-2015, 869, que suponen más del 80% del total declarado desde 2007, han ocurrido dentro de las fronteras de la Unión Europea.

2.3. Patogenia y manifestaciones clínicas de la enfermedad.

La vía principal de entrada del virus en el organismo es la oronasal (Montgomery, 1921; Plowright y *col.*, 1969; Wardley y *col.*, 1983) aunque son posibles otras rutas como la cutánea (por escarificación) la subcutánea, la intramuscular y la intravenosa (debido a la picadura de garrapatas). La replicación primaria del virus se produce en los monocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos mandibulares y de las tonsilas, si la infección es oral, o los monocitos y macrófagos de los ganglios linfáticos periféricos más próximos al lugar de entrada del virus (Heuschele y *col.*, 1966; McVicar, 1984).

Después de la replicación inicial en los sitios primarios de replicación, el virus se propaga a través de la sangre o el sistema linfático hacia los sitios secundarios de replicación: nódulos linfáticos, bazo, hígado, pulmón, riñón y médula ósea, en los cuales se produce un rápido incremento en los títulos del virus (Heuschele y *col.*, 1966; Coggins, 1974; Sánchez-Vizcaíno y Arias 2012). La infección generalizada

de estos órganos se produce a partir de los 3 días post-infección (dpi) y suele coincidir con la fase febril de la enfermedad (Plowright y *col.*, 1969; Hess, 1971).

La viremia comienza normalmente entre el segundo/tercer día o incluso el octavo dpi, dependiendo de la dosis y de la ruta de infección. El virus persiste en sangre, unido a los hematíes, durante largos períodos de tiempo debido a la ausencia de anticuerpos neutralizantes (Rodríguez y *col.*, 1993a). Además de la viremia y como consecuencia de la misma, en la sangre podemos observar leucopenia (disminución en el número de leucocitos), trombocitopenia (disminución del número de plaquetas) y un aumento considerable del tiempo de coagulación que, junto con la alteración de las células endoteliales, provoca las hemorragias características de la enfermedad (Wardley y *col.*, 1983).

El desarrollo clínico de la enfermedad dependerá fundamentalmente de la virulencia del aislado, de la dosis y vía de entrada y del estado inmunológico de los animales, siendo más frecuentes los procesos agudos o hiperagudos en zonas libres de la enfermedad al inicio de los brotes y la aparición de formas subagudas, de mortalidad más moderada, al cabo de un cierto periodo de tiempo. Finalmente, se desarrollan formas crónicas y de tipo subclínico en zonas endémicas de la enfermedad, que pueden ser debidas a una evolución del virus o de la propia enfermedad, en su proceso de adaptación al hospedador (Sánchez Botija, 1982).

En virtud de la virulencia de los aislados, ya sean virulentos, moderadamente virulentos y atenuados o de baja virulencia, se han definido distintos cursos clínicos de la enfermedad (Pan y Hess, 1984; Gómez-Villamandos y *col.*, 1995).

Los **aislados virulentos** son responsables de cursos hiperagudos y agudos de la enfermedad. Producen la muerte entre 1-4 dpi y 3-8 dpi respectivamente, tras un episodio de fiebre elevada y algún otro síntoma poco constante (Montgomery, 1921; Wardley y *col.*, 1983). En estas formas se observa una mortalidad de cerdos cercana al 100%.

El curso hiperagudo está caracterizado por fiebre muy elevada, pérdida de apetito inactividad y muerte repentina tras la aparición de estos síntomas clínicos.

El curso agudo es la forma más habitual de la enfermedad y puede estar causada por aislados virulentos o moderadamente virulentos (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

Los animales infectados presentan fiebre, que se mantendrá elevada hasta poco antes de la muerte, pérdida de apetito, postración, inactividad y secreciones nasales debidas al severo edema pulmonar. A nivel del aparato digestivo, aparece estreñimiento y menos frecuentemente, diarrea. Por otra parte surgen alteraciones circulatorias con hemorragias subcutáneas (aunque las podemos encontrar en los aparatos digestivo y respiratorio) con exantemas provocados por la intensa hiperemia que afecta especialmente a la piel de las orejas, de la cola, del abdomen y de las extremidades (Sánchez- Vizcaíno y Arias, 2012). También se puede observar una temprana leucopenia provocada por una linfopenia grave y variación en el número de monocitos. A medida que la enfermedad avanza los animales presentan temblores, descoordinación motora, debilidad en las extremidades, pudiendo llegar a

presentar evidencias de afectación del sistema nervioso central (Carrasco y col., 1996c; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a).

Junto con eritema y cianosis de la piel, las lesiones más características que presentan los animales son una marcada esplenomegalia, ganglios linfáticos congestivos y agrandados, así como hemorragias petequiales en la corteza del riñón, en la mucosa de la vejiga urinaria, epicardio, endocardio y de la pleura (Carrasco y col., 1997a b; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a).

Entre el 90 y el 100% de los animales afectados mueren en estado de shock generalmente una semana después del comienzo de la fiebre (Carrasco y col., 1996a, 2002).

Los **aislados de moderada virulencia** inducen cuadros agudos (con la muerte del animal en torno a los 11 -15 dpi) y subagudos (los animales mueren después del día 20 pi).

Las formas subagudas presentan un cuadro similar al que encontramos en la enfermedad aguda pero con menor intensidad y mayor duración, lo que permite ver síntomas que en las formas aguda no llegar a darse por la muerte del animal.

En las formas subagudas los cambios vasculares y los edemas son más intensos que en las formas agudas de la PPA (Gómez-Villamandos y col., 1995, 2013). Las hemorragias están relacionadas con el desarrollo de una intensa, aunque transitoria, trombocitopenia que se observa en etapas tempranas y medias de la enfermedad (Villeda y col., 1993; Gómez-Villamandos y col., 1998).

El aborto suele ser el primer signo clínico observable en hembras gestantes así como trastornos circulatorios que se manifiestan como eritemas cutáneos, edemas las cavidades abdominal y torácica, petequias en los riñones, más extensas que en las formas agudas y hemorragias en los ganglios linfáticos principalmente en los gastrohepáticos y renales, aunque también podemos encontrarlas en los ganglios submandibulares, retrofaríngeos, mediastínicos, mesentéricos e inguinales, que aparecen congestivos y hemorrágicos. Por otra parte, esta forma de la PPA puede cursar con una diarrea hemorrágica profusa y/o alteraciones en el sistema nervioso (Moulton y Coggins, 1968; Castagnoli, 1969).

La muerte de los animales puede ocurrir entre los 7 y 20 dpi en dos etapas diferentes: en fase de leucopenia o en la fase de recuperación, cuando aparecen las hemorragias (Gómez-Villamandos y col., 2013.), con una tasa de mortalidad que puede variar del 30 al 70%.

Por último, las formas crónicas y de tipo subclínico aparecen asociadas principalmente con la infección de **aislados de baja virulencia o atenuados**. Estas formas clínicas han ido descritas en la Península Ibérica, en la República Dominicana y en Brasil, así como en determinadas regiones de África, en cerdos afectados por virus de baja virulencia. Se ha planteado la hipótesis de que la forma crónica pudiera ser el resultado de la atenuación natural de VPPA en el campo o tuviera su origen en el virus de la vacuna experimental utilizada en la Península Ibérica en los años 1960 (Manso Ribeiro y col., 1963;. Moulton y Coggins, 1968; Mebus y col., 1978; Mebus y Dardiri 1979, 1980; Sánchez-Botija, 1982; Pan y Hess, 1984; Leitão y col., 2001; Sánchez-Vizcaíno y col., 2015).

Las formas crónicas están caracterizadas por una mortalidad baja (Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002) y síntomas clínicos inespecíficos: fiebre irregular, acompañada de inapetencia, pérdida de peso tos y artritis. En ocasiones pueden aparecer lesiones en la piel en forma de úlceras o áreas necrotizadas y en otras, alteraciones vasculares en la piel, pulmones congestivos y ganglios con hiperplasia y edemas (Sánchez Botija 1982; Gallardo y col., 2015c).

La sintomatología y lesiones que se producen por infecciones del virus de la PPA no pueden diferenciarse de las causadas por otras enfermedades hemorrágicas porcinas, como la Peste porcina clásica (o cólera porcino), Síndrome Respiratorio y Reproductivo Porcino, Erisipela, Salmonelosis aguda, Enfermedad de Aujeszky o envenenamiento, por lo que es esencial establecer un correcto diagnóstico diferencial mediante el análisis laboratorial, remitiendo muestras de los animales sospechosos (y aquellos con los que hayan podido tener contacto) para su análisis en el laboratorio.

2.4. Vías de transmisión.

La transmisión de virus de la PPA está directamente relacionada con la estabilidad y resistencia del virus a las distintas condiciones ambientales.

El vPPA es tremendamente estable a temperatura ambiente y resistente tanto al calor como al procesado, lo que hace que pueda permanecer infectivo durante mucho tiempo incluso en productos cárnicos tratados (**tabla I**).

Tabla I.- Tiempos de supervivencia del vPPA a distintas condiciones ambientales y en productos cárnicos. Fuente: EFSA, 2010 (trabajos de Adkin y col., 2004; Mebus y col., 1993 y, 1997).

CONDICIONES		TIEMPO DE SUPERVIVENCIA
Temperatura de 50°C		3 horas
Temperatura de 56°C		70 minutos
Temperatura de 60°C		20 minutos
Sangre conservada a 4°C		18 meses
Sangre en estado de descomposición		15 semanas
Heces a temperatura ambiente		11 días
En carne y carne manufacturada		
Carne con o sin hueso		105 días
Carne congelada		1000 días
Carne cocinada durante 30 min a 70°C		0 días
Carne en salazón		182 días
Carne desecada		300 días
Carne ahumada		30 días
Piel o en la grasa		300 días
En productos Ibéricos curados		Tiempo de curación
Jamón ibérico	140 días	365-730 días
Paletilla	140 días	240-420 días
Lomo ibérico	112 días	90-130 días
Jamón serrano	140 días	180-365 días

Estas características suponen una increíble ventaja para el virus en términos de diseminación: la historia ha demostrado que la entrada el virus en un país libre suele ser a través de restos de carne de cerdo (o productos cárnicos) contaminados que se han servido de alimento para otros cerdos (Sánchez-Botija, 1982; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

Así los tres saltos intercontinentales a través de los cuales el vPPA ha llegado a Europa, los dos primeros ocurrido en los años 57 y 60 en Lisboa y el tercero ocurrido en 2007 en Georgia, se han producido a consecuencia de restos alimenticios contaminados que y que sirvieron de alimento a cerdos naïve en Lisboa y en el puerto de Poti, Georgia (Sánchez-Botija, 1982; Rowlands y *col.*, 2008; Beltrán-Alcrudo y *col.*, 2008; EFSA, 2010; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a). Asimismo, la entrada en países de Centroamérica, como República Dominicana y Haití se produjo presumiblemente por carnes infectadas o animales vivos no controlados (Sánchez-Botija, 1982).

La comida y productos contaminados en general constituyen factores de alto riesgo y una de las principales vías para la difusión de la PPA: además de las importaciones legales e ilegales, existe la posibilidad de que desplazamientos vacacionales, envío de comidas a familiares, etc. y en general movimientos de productos cárnicos contaminados destinados al consumo humano, que pueden terminar siendo alimento para los suidos, (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015). Estos factores son los responsables tanto de la aparición de nuevos brotes ocurridos en numerosos países en la década de 1970 como ocurridos en Bélgica en 1985 o en Francia, Italia y Malta entre 1964 y 1978, como al mantenimiento de la enfermedad en zonas endémicas, bien a través de reinfecciones en la población de cerdos domésticos, bien a través de los suidos silvestres (Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a).

La entrada de virus en un país libre puede ocurrir también por la introducción de animales infectados bien por la comercialización y el transporte de los mismos, bien por el paso de animales silvestres para los que no existen fronteras, como ha ocurrido los países de la UE a través de Bielorrusia (OIE informe de situación, 2015). En este último caso hay que tener en cuenta que, aunque la introducción de la PPA puede ocurrir por jabalíes, estos no son los responsables de diseminaciones a largas distancias puesto que son más bien sedentarios, aunque la distancia de sus desplazamientos puede variar en función de la disponibilidad de comida u otros factores externos como la presión de la caza (EFSA, 2010).

Una vez el virus se ha introducido en una región, la diseminación se debe fundamentalmente al contacto directo entre animales aunque también puede darse por una vía indirecta en la que el virus se transmite de un animal enfermo a otro sano vía comida, bebederos, purines, camiones, personal de la explotación, o a través de los vectores, las garrapatas blandas del género *Ornithodoros*, que pueden influir de forma decisiva en la creación de focos enzoóticos (Sánchez-Botija, 1963; Hess y *col.*, 1987; Plowright y *col.*, 1994; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002, 2012; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2006; EFSA, 2010; Gogin y *col.*, 2013).

La difusión del virus comienza en animales infectados, que pueden empezar a eliminar virus a partir del segundo día post-infección por la saliva y por las secreciones oculares y nasales, antes incluso de que aparezcan los primeros síntomas, mientras que pasados unos días, tras la replicación del virus en los tejidos, el animal enfermo puede eliminarlos también a través de la orina, las heces (sobre todo si contienen sangre), el semen e incluso a través de aerosoles, principalmente en las formas agudas, hasta el día 25-30 dpi (Montgomery, 1921; Kovalenko, 1965; McVicar, 1984; de Carvalho Ferreira y *col.*, 2013b Davies y *col.*, 2015).

Durante todas las fases de la enfermedad, incubación, aparición de los síntomas clínicos y convalecencia, el animal presenta viremia, por lo que siempre podrá contagiar a través de la sangre, que además es el fluido en el que encontramos las mayores cantidades de virus, por lo que ésta se convierte en la ruta más común y eficaz de transmisión (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2006; Blome y *col.*, 2013).

El virus de la PPA induce infecciones persistentes por lo que los animales supervivientes a la infección y recuperados de la enfermedad, poseen todavía la capacidad para contagiar el virus, constituyendo los denominados animales portadores. Éstos, no presentan síntomas clínicos pero mantienen el virus y siguen secretándolo, por lo que siguen siendo contagiosos (Sánchez-Botija, 1982, de Carvalho Ferreira y *col.*, 2012, 2013a). Los animales portadores por lo tanto, juegan un papel importante tanto en el mantenimiento de la enfermedad en una región, como en la diseminación hacia zonas libres (Leitão y *col.*, 2001; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a).

En experimentos llevados a cabo con cepas moderadamente virulentas en los años noventa, se comprobó que los animales recuperados de la infección eran capaces de seguir infectando por contacto directo hasta 30 dpi, mientras que a través de la sangre la infección se producía hasta el día 56 dpi (Wilkinson 1989). En trabajos más recientes, realizados también con aislados de moderada virulencia, se ha demostrado que un elevado proporción de animales infectados secretan el virus al medio durante al menos 70 días, principalmente vía oronasal y en menor medida a través de las heces, incluso en ausencia de viremia, signos clínicos o fiebre (de Carvalho Ferreira y *col.* 2012, 2013b).

Otros experimentos han demostrado el contagio por animales portadores a cerdos susceptibles a los 2 meses de ser infectados, e incluso la presencia del virus en determinados tejidos (pulmones y nódulos linfáticos) después de tres meses de infección (Gallardo y *col.*, 2015c). No se ha demostrado transmisión a partir de los 5 meses. Además del peligro que supone para la transmisión, el contacto directo entre un animal portador y un animal sano, los portadores inaparentes (aparentemente sanos) suponen un peligro por su uso potencial como alimento o que sus canales puedan servir de alimento a suidos silvestres. En estos casos el virus acantonado en los tejidos podría ser ingerido, comenzando de nuevo el ciclo de infecciones-reinfecciones. Distintos experimentos han confirmado la presencia de virus en tejidos hasta los 6 meses (Mebus y Dardiri, 1980; EFSA, 2010; Gallardo y *col.*, 2015c).

Por ello, uno de los puntos críticos en los programas de erradicación radica en el sacrificio de todos los animales que presenten anticuerpos frente al vPPA (Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002).

2.4.1. Ciclos de transmisión del vPPA en el hospedador.

Los mecanismos de transmisión del virus en los animales domésticos y silvestres son variables y complejos. Estudios realizados han mostrado mediante el análisis del genoma con enzimas de restricción y por secuenciación parcial del extremo C-terminal del gen que codifica para la proteína p72 (*B646L*) que los aislados circulantes por Europa en los años 70, los aislados obtenidos en el Caribe, América y el Oeste de África estaban muy relacionados pudiéndose englobar todos ellos dentro genotipo I de la p72, mientras que en los aislados del Este y Sur de África aparecía una elevada variabilidad, encontrándose aislados representantes de los 22 genotipos basados en el gen de la p72 descritos hasta la fecha por Bosthoff y col., en 2007 (Lubisi y col., 2005, 2007; Nix y col., 2006; Gallardo y col., 2009a, 2011a,c; Giammarioli y col., 2011).

Una de las causas de esta variabilidad genética podría ser debida a los diferentes mecanismos de transmisión que se observan en esas zonas. Concretamente en este y sur de África existe un complejo ciclo de transmisión en el que intervienen tanto a las garrapatas blandas del género *Ornithodoros* (*O. moubata*) como jabalíes silvestres asintomáticos (Oura y col., 1998a; Kleiboeker y Scoles, 2001; Penrith y col., 2004b; Bastos y col., 2009). En este ciclo, denominado selvático, tanto las garrapatas como los facóqueros adultos actúan de hospedadores finales asintomáticos (Bastos y col., 2009; Jori y col., 2013). Éstos presentan viremias intermitentes que son insuficientes para infectar a *O. moubata*, con las que comparten madrigueras y también para permitir la transmisión horizontal o vertical. Los niveles de viremia necesarios para infectarlas sólo se encuentran en los jóvenes facóqueros lactantes, que presentan una inmunidad aún limitada, por lo que si éstos son infectados por una garrapata residente en la madriguera que cohabitan, desarrollaran los niveles de virus suficientes para infectar a otra garrapata que se alimente de su sangre posteriormente. Dado que los partos ocurren estacionalmente, la infección de jóvenes suidos y de garrapatas también lo serán y el ciclo se mantiene anualmente (Penrith y col., 2004a; Jori y col., 2009; Plowright, 1977; Jori y col., 2013).

Periódicamente, se producen infecciones de animales domésticos que sí son susceptibles de padecer la enfermedad y una vez que el virus está establecido en la población de cerdos domésticos, puede ser transmitido entre ellos por la picadura de garrapatas, ingestión de carne contaminada o por contacto directo entre animales (Bastos y col., 2003; Sumption y col., 1990; Wesley y col., 1984; Genovesi y col., 1988; Plowright y col., 1969; Thomson y col., 1985).

Incluso se ha descrito la posibilidad de transmisión de cerdo doméstico a jabalí (Gallardo y col., 2011c).

En zonas endémicas se han descrito dos ciclos adicionales:

El ciclo doméstico (cerdo-cerdo), en el que el virus se mantiene y persiste a través de infecciones y reinfecciones únicamente por contacto directo entre cerdos domésticos y por fómites (Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a). El movimiento de animales, la falta de medidas adecuadas de bioseguridad y los malos hábitos ganaderos contribuyen enormemente al mantenimiento de este ciclo de infecciones (Costard y col., 2013b).

El ciclo cerdo domestico-garrapata, en el que el virus persiste en la población en ausencia de suidos silvestres pero con la ayuda de garrapatas que infestan las pocilgas. Descrito sobre todo en África y en la Península Ibérica, (Wilkinson y col., 1988; Oleaga-Perez y col., 1990; Penrith y col., 2004a; Jori y Bastos, 2009).

En el Este y Sur de África están presentes los tres ciclos descritos, mientras que en el Oeste de África los brotes se relacionan con movimientos de cerdos o productos de cerdo contaminados, sin que se haya demostrado hasta la fecha la actuación de garrapatas y de suidos silvestres (Gallardo y col., 2011c; Costard y col., 2013b).

En la Península Ibérica, donde la enfermedad estuvo presente más de tres décadas, el contagio ocurría principalmente entre cerdos por contacto directo, o por ingestión de comida contaminada, aunque en ciertas zonas del suroeste de la península las garrapatas del género *Ornithodoros erraticus*, jugaron un papel relevante ya que éstas adquieren el virus cuando se alimentan con la sangre de cerdos infectados con el VPPA y pueden transmitirlo tanto a cerdos sanos, como a otros congéneres (de macho a hembra) durante la cópula (Caiado y col., 1988; EFSA, 2010; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002).

En Cerdeña el ciclo de infecciones y reinfecciones se debe principalmente al contacto entre cerdos siendo el ciclo doméstico, sin presencia de vectores, el más frecuente a pesar de que la existencia de jabalíes incrementa el riesgo de brotes (Giammarioli y col., 2011). La ganadería no estabulada, que predomina en ciertas zonas de la isla, con áreas comunales de pasto compartidas por jabalíes, cerdos asilvestrados y cerdos criados en semilibertad y la ausencia de censo en muchas de las granjas de cría no profesionales favorecen la transmisión del virus entre estos grupos, colaborando así en el mantenimiento de la enfermedad en la isla (Mannelli y col., 1997, 1998; Sánchez-Vizcaíno y col., 2009; Mur y col., 2014a; Martínez-López y col., 2015).

De forma similar, en la región del Cáucaso todo apunta a que la infección se mantiene principalmente entre los animales silvestres y asilvestrados con el cerdo doméstico, bien por contacto directo entre ellos o a través de la alimentación, tanto de canales de animales muertos infectados como de restos de comida contaminada, sobre todo en ciertas zonas en las que predomina la ganadería familiar de traspatio (Beltrán-Alcrudo, 2008; Jori y Bastos, 2009; Oganessian y col., 2013; Gogin y col., 2013).

Figura 11 → Mapa con los brotes en cerdo doméstico declarados en la UE clasificado por tipo de unidad epidemiológica: unidades de traspaso (●) vs explotaciones (●). Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia



3. VIGILANCIA Y CONTROL DE LA PPA.

En ausencia de una vacuna eficaz, la vigilancia y el control de la PPA se basa entre otras medidas, en una detección temprana en campo y un diagnóstico rápido y fiable, para establecer las medidas sanitarias más oportunas (Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; EFSA, 2010; Sánchez –Vizcaíno y col., 2012 y 2015).

3.1. Vacunas y estrategias vacunales.

Debido a la gran complejidad estructural del virus, al elevado número de proteínas sintetizadas al desconocimiento de los mecanismos inmunológicos que median en la protección y a la ausencia de anticuerpos que neutralicen el virus de forma efectiva y total, hasta la fecha no ha sido posible obtener una vacuna frente a la PPA, a pesar de que ya en los años ochenta se realizaron los primeros intentos de inmunización (Gómez-Puertas y col., 1996; Blasco y col., 1989; Agüero y col., 1990).

Posteriormente se han seguido tres tipos de estrategias principales para obtener una vacuna que confiera una protección real frente al vPPA:

- **Vacunas con virus inactivados:** capaces de inducir respuestas de anticuerpos, a pesar de que los ensayos realizados no consiguieron inducir protección frente a la infección (de Tray, 1957; Stone y Hess, 1967; Forman y col., 1982; Edwards y col., 1985).
- **Vacunas de subunidades:** siendo una opción prometedora por sus ventajas principalmente en el ámbito de la seguridad, todavía no se ha conseguido una protección efectiva, ni al utilizar distintas aproximaciones de proteínas recombinantes ni, más recientemente, de virus (parapoxvirus y parvovirus) recombinantes, en inoculaciones experimentales (Tabarés y col., 1983; ASForce EU Project 2012-2015). En la misma línea se han movido los candidatos

vacunales de ADN, donde en el mejor de los casos se ha conseguido un retraso de la infección por el virus virulento (Argilaguet y *col.*, 2011, 2012, 2013).

- **Vacunas con cepas atenuadas:** de momento son las que están dando mejor resultado, ya que está ampliamente descrito en la bibliografía que inoculaciones con cepas de campo atenuadas procedentes de cerdo doméstico o garrapata han conferido protección frente a dosis letales de aislados virulentos homólogos e incluso, frente a heterólogos (Manso-Ribeiro y *col.*, 1963; Leitão y *col.*, 2001; Boinas y *col.*, 2004; King y *col.*, 2011; Gallardo y *col.*, 2012b; Takamatsu y *col.*, 2013; Mulumba-Mfumum y *col.*, 2015). A pesar de los alentadores resultados, los problemas de seguridad existentes con estos candidatos vacunales no están resueltos por lo que su aplicación no es a día de hoy una opción como potencial vacuna, debido a los síntomas clínicos y lesiones asociados al curso crónico de la PPA que llegan a provocar en un número muy significativo de animales: altos títulos de anticuerpos, viremias leves e intermitentes, focos necróticos en articulaciones y edemas pulmonares (Leitão y *col.*, 2001; Gallardo y *col.*, 2012b; 2015c).

Otras aproximaciones están empleando mutantes de delección, mediante eliminación o inhibición de la actividad de genes asociados a virulencia o a la replicación del virus, o candidatos de virus atenuados por pases en cultivo (Zsak y *col.*, 1996; Boinas y *col.*, 2004; Lewis y *col.*, 2000; Zsak y *col.*, 1996; Neilan y *col.*, 2004; Salguero y *col.*, 2008; Salas y *col.*, 2012; Abrams y *col.*, en 2013; Krug y *col.*, 2014).

3.2. Puntos importantes en la prevención y control.

Actualmente, en la mayoría de los países la medidas de prevención de la PPA están basadas en los factores de riesgo de entrada y difusión, para lo cual está siendo necesario un aumento significativo del en el control de multitud de parámetros como censos actualizados, tipos y hábitos de producción porcina o movimientos, transporte y comercialización de animales y productos de origen porcino. También ha sido necesaria la mejora en el conocimiento de los hospedadores del virus particularmente en el papel que éstos juegan en cada escenario y su distribución geográfica, los mecanismos de transmisión del virus, el desarrollo de mapas de presencia de vectores susceptibles, los animales portadores, etc. (Wooldridge y *col.*, 2006; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2006; Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a). Dada la situación de riesgo actual, los países están llevando a cabo campañas de sensibilización e información, dirigidas a aquellos sectores que podrían verse implicados, servicios veterinarios, ganaderos, cazadores, veterinarios, distribuyendo guías sobre la enfermedad y protocolos de actuación en caso de sospecha, con el fin de evitar retrasos en la detección en campo (Beltrán-Alcrudo y *col.*, 2009 Vergne y *col.*, 2014; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

La detección temprana de los animales infectados en el campo constituye uno de los pilares básicos más importantes para que el control de la PPA pueda ser realmente efectivo (Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002, Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a; Sánchez Vizcaíno y *col.*, 2014). Otro de los

pilares fundamentales es el diagnóstico de laboratorio, que confirmará las sospechas de presencia de la enfermedad. El diagnóstico laboratorial es particularmente importante en el caso de la PPA debido a la dificultad para diferenciar los síntomas y lesiones, en algunos casos inespecíficos (fiebre, letargia) y hemorrágicos, con otras enfermedades hemorrágicas porcinas o condiciones septicémicas (Castagnoli y *col.*, 1969, Oura y *col.*, 2013; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

En los últimos años han hecho su aparición los modelos matemáticos de análisis de riesgo y difusión, que estudian la probabilidad de entrada de la enfermedad en un país o región y su posible dispersión (Mur y *col.*, 2012b, c; Costard y *col.*, 2013a; Nigsch y *col.*, 2013; de la Torre y *col.*, 2013; Martínez-López y *col.*, 2015; Roelandt y *col.*, 2015). Estos modelos analizan los factores de riesgo asociados a distintas vías de entrada, pudiendo establecer así un riesgo “general” que integra las distintas vías de entrada en un país, entre las que se incluyen el transporte, el movimiento de los animales, suidos salvajes, carnes y productos cárnicos y comercio legal e ilegal (de la Torre y *col.*, 2013; Iglesias y *col.*, 2014; Mur y *col.*, 2014c).

Esta información supone un gran ventaja a la hora de identificar y priorizar las áreas de actuación con los medios disponibles ya que el control constituye todo un reto: exige una estrecha colaboración entre los distintos sectores implicados como son los servicios veterinarios, cazadores, epidemiólogos y laboratorios de diagnóstico que contribuya al cumplimiento de unas normas adecuadas que eviten la propagación de la enfermedad. Entre ellas encontramos normas higiénicas y de bioseguridad que incluyen tanto pautas para la correcta eliminación de los cadáveres como medidas para reducir el contacto entre jabalíes, cerdos asilvestrados y cerdos domésticos. Por otra parte el envío de muestras de los jabalíes encontrados muertos y/o abatidos en las cacerías es de especial importancia (Beltrán-Alcrudo, 2008; EFSA, 2010; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015; 2002/60/CE 2002, artículos 15 y 16 refrendada por la 2014/442/UE, 2014). En este sentido y considerando la importancia de la vida silvestre en la diseminación de la PPA en la UE, los modelos matemáticos desarrollados específicamente para comprender la dinámica de la PPA en el jabalí pueden ser de gran ayuda a la hora de evaluar aquellas zonas de mayor riesgo e implementar medidas de vigilancia y control más efectivas y nuevos sistemas de alerta para la detección temprana siempre que fuera necesario (de la Torre y *col.*, 2013; Iglesias y *col.*, 2015; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2015).

4. DIAGNÓSTICO DE LA PPA.

Hoy en día se dispone de un amplio abanico de técnicas en constante evolución y mejora para la detección tanto del virus como de los anticuerpos que se producen en los animales infectados (Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a; Manual de la OIE, 2012). Estas técnicas permiten de forma segura y fiable la detección tanto de animales infectados como de los supervivientes recuperados de la infección y capaces de transmitirla.

Para poder realizar un diagnóstico fiable de la PPA es muy importante una correcta elección y conservación de las muestras a analizar, ya que *“no puede haber un buen diagnóstico sin una buena*

muestra” (Manual Práctico de Operaciones contra la PPA, 2013, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España).

Las muestra de elección para el análisis de la PPA es el suero, siendo también de gran utilidad las muestras de sangre con anticoagulante (nunca con heparina), ganglios (gastrohepáticos, retrofaríngeos, submandibulares y renales), tonsila, bazo, riñón, pulmón, médula ósea y garrapatas del género *Ornithodoros* para detectar la presencia del virus.

A excepción de las muestras de garrapatas, en todas las anteriormente mencionadas es posible realizar el diagnóstico completo de la PPA, ya que en todas es posible la detección del agente causal de la PPA y, en caso de estar presentes, de los anticuerpos específicos. En el caso de los tejidos es necesario extraer la fracción de líquido intersticial (el exudado) de los mismos (Gallardo y *col.*, 2013; 2014b). Este último punto es de gran relevancia, ya que de acuerdo con la decisión de la Comisión Europea de mayo de 2003 (2003/422/EC, refrendada por 2014/709/UE, 2014) para un correcto diagnóstico de la PPA es necesario realizar en paralelo técnicas para la detección de virus de la PPA (técnicas virológicas) como de detección de anticuerpos (técnicas serológicas).

El mantenimiento de las muestras en condiciones óptimas es un punto clave del diagnóstico. Esto, en ocasiones, no es fácil, como en el caso de la toma de muestras de animales silvestres, o en zonas tropicales (Boadella y *col.*, 2011). Para tratar de solventar este problema, en los últimos años se está trabajando en el desarrollo de alternativas al muestreo tradicional que pueden facilitar la recogida y sobre todo el mantenimiento de las mismas.

Se ha descrito la utilidad de muestras de sangre recogida en filtros de papel secante (Filtros Whatman 3-MM) incluso en condiciones deficientes de conservación, como altas temperaturas o muestras también de sangre recogidas en hisopos para la detección tanto del anticuerpos como del genoma del vPPA (Uttenthal y *col.*, 2013; Randriamparany y *col.*, 2014; Blome y *col.*, 2014; Petrov y *col.*, 2014).

También se está trabajando en muestras alternativas muy prometedoras para el diagnóstico de la PPA, como el fluido oral, en el que se han detectado anticuerpos frente al virus, aunque con títulos más bajos que los que se pueden encontrar en el suero y el jugo de carne, en el que un estudio preliminar realizado en el EURL ha demostrado su validez tanto para la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA (hasta ahora mediante inmunoperoxidasa indirecta) como la detección del propio virus (Mur y *col.*, 2013; Gallardo y *col.*, 2014b, 2015a).

4.1. Técnicas de detección virológica.

Actualmente existe un importante número de técnicas de gran sensibilidad y fiabilidad para el diagnóstico virológico. Algunas de ellas son técnicas clásicas, sencillas y específicas que se desarrollaron en los años 60, como el test de de la Hemoadsorción y otras son más modernas y

rápidas, que ofrecen la misma fiabilidad y sensibilidad como son los distintos sistemas basados en la detección del genoma viral por PCR.

A continuación se describen las técnicas más utilizadas actualmente para la detección del vPPA o su genoma y la detección de antígenos virales:

4.1.1. Test de la Hemoadsorción (Malmquist y Hay, 1960):

Basada en la capacidad del vPPA de infectar y replicar de forma natural en cultivos primarios de leucocitos de sangre periférica de cerdo, donde además de producir un efecto citopático en los macrófagos infectados, origina un efecto característico de Hemoadsorción (HAD), previo a la lisis celular.

Este efecto, que al microscopio se observa como una mórula o roseta de eritrocitos alrededor de los leucocitos infectados, consiste en la adsorción de los hematíes del cerdo alrededor de los macrófagos infectados.

Es una técnica muy sensible, pero su realización requiere varios días y precisa del mantenimiento de cerdos donantes de leucocitos e instalaciones adecuadas (Manual de la OIE, 2015). Algunas cepas de campo producen solamente efecto citopático pero no hemoadsorción (cepas no hemoadsorbentes) y es necesario confirmar la presencia del virus mediante otras técnicas como la PCR o la Inmunofluorescencia directa (IFD) (Bool y col., 1969).

La reacción de hemoadsorción sigue siendo hoy en día el método más específico para identificar el vPPA, puesto que ningún otro virus porcino produce este efecto, por lo que sigue siendo la técnica de referencia para la confirmación de un resultado positivo o dudoso obtenido previamente mediante la técnica de ELISA de antígeno, la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o la Inmunofluorescencia Directa (IFD), sobre todo en caso de brotes primarios de la PPA (Manual de la OIE, 2015; Oura y col., 2013).

4.1.2. Detección de antígenos virales:

Inmunofluorescencia directa (IFD) y ELISA de Antígeno (Ingezim PPA DAS 11.PPA.K.2, Ingenasa, España; Bool y col., 1969), que permiten la detección de la PPA mediante la detección de antígenos presentes en la superficie de la partícula viral.

La IFD está basada en la detección de antígenos virales en cortes o improntas de tejidos de animales susceptibles de estar infectados, mediante reacción con un conjugado fluorescente anti-virus de modo que el patrón de positividad observado son unos gránulos fluorescentes en el citoplasma de las células de las muestras (Oura y col., 2013).

Tanto la IFD como el ELISA de Ag únicamente están recomendadas en caso de enfermedad aguda, puesto que la presencia de anticuerpos facilita la formación de inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, provocando así la aparición de reacciones falso negativas que hacen descender la sensibilidad de estas técnicas al 40% (Steiger y *col.*, 1992; Oura y *col.*, 2013; Gallardo y *col.*, 2014b). Por ello, dado que hoy existen sistemas de detección más sensibles, como la PCR, sólo se recomiendan como test de grupo y siempre analizando la muestra con técnicas de detección de anticuerpos (Oura y *col.*, 2013).

4.1.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Permite la detección específica del ADN del vPPA mediante la amplificación de un pequeño fragmento del genoma viral, delimitado por una pareja de cebadores específicos, que será el molde de la reacción enzimática. Mediante la técnica de PCR se pueden analizar distintos tipos de muestras, como sobrenadantes de cultivo celular, sangre recogida en EDTA, suero y homogeneizados tanto de tejidos como de garrapatas, siendo particularmente útil para en muestras mal estado de conservación.

La PCR es una técnica de elevada especificidad y sensibilidad, que permite detectar la presencia de virus incluso antes de la aparición de los primeros signos clínicos en los animales infectados, desde el segundo día post infección (dpi) en sangre y tercer día post infección en suero y hasta varios meses post infección, dado que el vPPA induce una viremia que puede prolongarse durante varias semanas (Agüero y *col.*, 2003; King y *col.*, 2003; Gallardo y *col.*, 2015c).

La PCR es una técnica rápida puede utilizarse tanto en el diagnóstico de rutina como en los planes de vigilancia control y erradicación de la PPA o a la hora de establecer patrones epidemiológicos de evolución de la enfermedad. Es la técnica de elección en casos hiperagudos, agudos, subagudos y con la mejora de las nuevas técnicas de PCR en tiempo Real, también de los casos crónicos de la PPA.

Aunque se han descrito numerosas técnicas moleculares para la detección de VPPA, dos son las técnicas recomendadas por la Organización Mundial de Sanidad Animal (Manual de la OIE, 2015) en el Manual de Pruebas de Diagnóstico y Vacunas para los Animales Terrestres: la desarrollada por Agüero y *col.* en el año 2003 y la desarrollada por King y *col.*, también en el año 2003 (Steiger y *col.*, 1992; Agüero y *col.*, 2004; King y *col.*, 2003; Hjertner y *col.*, 2005; Zsak y *col.*, 2005; Basto y *col.*, 2006; Giammarioli y *col.*, 2008; James y *col.*, 2010; McKillen y *col.*, 2010; Ronish y *col.*, 2011; Tignon y *col.*, 2011; Fernández-Pinero y *col.*, 2013).

Dependiendo del fragmento que se desee amplificar, en cada PCR se utilizan unos cebadores característicos que delimitan el amplicón. Por lo general las PCRs utilizadas para detectar presencia/ausencia del virus, emplean parejas de cebadores diseñados para amplificar un fragmento correspondiente a una región altamente conservada de la p72, asegurando así la

detección de aislados pertenecientes los 22 genotipos descritos hasta el momento, tanto cepas hemoadsorbentes como no hemoadsorbentes y aislados de alta y baja virulencia (Yu y *col.*, 1996).

Dos son los sistemas más utilizados:

- **PCR convencional:** el producto amplificado es detectado mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior visualización por irradiación con luz UV. Dentro de este grupo encontramos la PCR descrita por Agüero y *col.*, en 2003.
- **PCR en Tiempo Real:** requiere de una pareja de cebadores y una sonda específicos, características de cada una de las PCRs disponibles (King y *col.*, 2003; Zsak y *col.*, 2005; Tignon y *col.*, 2011; Fernández-Pinero y *col.*, 2013). En todas ellas, la sonda está marcada en su extremo 5' con una molécula emisora de fluorescencia y en el 3' con una molécula apantalladora de modo que al ir hidrolizándose (conforme avanza la amplificación), el equipo registra la fluorescencia emitida de forma proporcional a la acumulación del amplicón.

Además de la descrita por King y *col.* en el año 2003, en los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas de PCR más sensibles y específicas: Tignon y *col.*, 2011 y Fernández-Pinero y *col.*, 2013.

En concreto, la PCR desarrollada por Fernández-Pinero y *col.* en 2013 presenta unos cebadores diseñados contra la región más conservada del genoma que codifica para la p72 e incluye una Sonda Universal (Universal Probe Library, UPL, Roche Diagnosis GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Alemania) que permite, en combinación con los cebadores, la detección del vPPA tanto en tiempos tempranos (primer día post infección (dpi) en muestras de sangre y tercer dpi en muestras de suero) como en tiempos tardíos de infección (Fernández-Pinero y *col.*, 2013).

También han aparecido en el mercado dos kits comerciales: Kit Tetracore® (Tetracore, Estados Unidos) e INgene® qPPA (Ingenasa, España. Redondo y *col.*, 2014) para la detección en tiempo real del vPPA y basados en las PCRs diseñadas por Zsak y *col.* en 2005 y por Fernández-Pinero y *col.* en 2013 respectivamente.

4.2. Técnicas de detección serológica.

Dado que no existe una vacuna, la presencia de anticuerpos del vPPA es siempre indicio de infección previa. Constituyen unos buenos marcadores para el diagnóstico de la enfermedad debido a su aparición temprana, en torno a los 7-10dpi y su persistencia a largo plazo convierten a las técnicas de detección de anticuerpos en herramientas tremendamente útiles en el diagnóstico de las formas subaguda y crónica de la enfermedad así como para la realización de pruebas a gran escala o programas de erradicación (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 1986; Pastor y *col.*, 1990; Alcaraz y *col.*, 1990; Arias y Sánchez-Vizcaíno, 2002; Gallardo y *col.*, 2009b; Sánchez-Vizcaíno y Arias 2012).

Actualmente y de acuerdo con la normativa establecida por la OIE en el Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (OIE, 2015b) para el diagnóstico

serológico se emplea primeramente una técnica de cribado, el ELISA. Todas las muestras positivas y dudosas deberán ser confirmadas por una técnica alternativa como el Inmunoblotting (IB), inmunoperoxidasa indirecta (IPT) o la inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Gallardo y *col.*, 2009b; 2013).

De las 150 proteínas que induce el virus al en los macrófagos infectados, 54 están asociadas al ensamblaje y formación de nuevos viriones y muchas son altamente inmunogénicas (Tabarés y *col.*, 1980; Alcaraz y *col.*, 1989; Oviedo y *col.*, 1997; Gómez-Puertas y *col.*, 1998; Pérez-Filgueira y *col.*, 2006; Gallardo y *col.*, 2009b; Salas y Andrés, 2013). Entre ellas destacan la proteína p72, la p54 y la p30 que constituyen las dianas de la mayoría de las técnicas serológicas de barrido actualmente empleadas (Tabarés y *col.*, 1980a, b; Oviedo y *col.*, 1997; Gómez-Puertas y *col.*, 1998; Pérez-Filgueira y *col.*, 2006, Gallardo y *col.*, 2009b).

4.2.1. ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).

Se empezó a desarrollar para el diagnóstico de la PPA a finales de los 70 principios de los 80 y hoy es la técnica de cribado más utilizada en la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA a gran escala, fundamentalmente debido a que es un tipo de técnica, rápida, sencilla de realizar y de fácil interpretación.

Actualmente existen distintos ELISAS disponibles para la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA, siendo los más utilizados los que refieren a continuación:

- **ELISA indirecto** (ELISA-OIE): es la técnica prescrita para el comercio internacional por la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) en el Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres (Manual de la OIE, 2015).

Basado en la adsorción de un extracto semipurificado del antígeno soluble citoplasmático del vPPA obtenido a partir de células infectadas, que contiene la mayoría de las proteínas de infección del virus y un conjugado marcado con peroxidasa (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 1979, 1982; Escribano y *col.*, 1989; Pastor y *col.*, 1990; Pastor y Escribano, 1990).

A pesar de su sensibilidad y robustez, en este ELISA la conservación de los sueros es clave, ya que sueros en mal estado de conservación pueden dar resultados falso-positivos o falso-negativos (Arias y *col.*, 1993; Pérez-Filgueira y *col.*, 2006; Gallardo y *col.*, 2009 b).

- **ELISA de Bloqueo** (Ingezim PPA COMPAC 11.PPA.K.3, Ingenasa, España): basado en la adsorción de la vp73 del vPPA al soporte inmunoabsorbente y un anticuerpo monoclonal frente a la vp73 marcado con peroxidasa. Está completamente validado, pero a pesar de su buen rendimiento, en muestras hemolizadas presenta resultados falso-positivos (Gallardo y *col.*, 2014b).

Se han desarrollado otros ensayos ELISA que utilizan las proteínas recombinantes p30, p54, pp62 y el p602L como antígenos. Estos nuevos ELISAS han supuesto una mejora en sensibilidad y especificidad sobre todo en muestras en mal estado y en ellos se basan otros ELISAS comerciales disponibles en mercado, como la proteína p32 (Svanovir[®] ASFV-Ab ELISA) o las proteínas p32, p72 y pp62 (Idvet ID Screen[®] African swine fever Indirect ELISA kit), (Pérez-Filgueira y *col.*, 2006; Oviedo y *col.*, 1997; Alcaraz y *col.*, 1995; Barderas y *col.*, 2001; Gallardo y *col.*, 2006; Kollnberger y *col.*, 2002; Gallardo y *col.*, 2009b).

4.2.2. Técnicas de confirmación serológica.

Utilizadas para confirmar el resultado de muestras positivas y dudosas obtenidas mediante la técnica de ELISA y para el análisis de sueros mal conservados y/o en un estado en el que puedan obtenerse resultados falso-negativos mediante la técnica de ELISA.

- **Inmunoblotting (IB)** (Pastor y *col.*, 1989): técnica inmunoenzimática que utiliza como soporte filtros de nitrocelulosa en los que las proteínas virales comprendidas en el rango de pesos moleculares de 23 a 35 kDa, previamente separadas por electroforesis en geles de poliacrilamida y transferidas a la membrana de nitrocelulosa, actúan como antígeno. Si el suero problema presenta anticuerpos, éstos se unirán a las proteínas presentes en la tira y en presencia del sustrato producirán un precipitado coloreado (Alcaraz y *col.*, 1990).

Es utilizada como técnica de confirmación de muestras positivas y dudosas obtenidas en ELISA así como para el análisis de muestras mal conservadas, que pudieran dar resultado falso-negativo en esta técnica. Aunque ofrece buenos resultados al analizar muestras de suero, independientemente del estado de conservación, no se recomienda su uso en muestras de exudado ni jugo de carne.

Ha demostrado ser una técnica suficientemente sensible y específica para llevar a cabo el diagnóstico ASF durante los programas de erradicación y vigilancia para el control de la PPA (Alcaraz y *col.*, 1990; Arias y *col.*, 1993). Su sensibilidad es limitada con bajos niveles de anticuerpos en los animales infectados, como por ejemplo al principio de la infección, cuando la respuesta de anticuerpos está empezando.

- **Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)** (Bool y *col.*, 1969; Sánchez-Botija 1970) basada en la unión de los anticuerpos específicos frente al vPPA de las muestras a los virus presentes en un tapiz de células infectadas. La reacción antígeno-anticuerpo se detecta por medio de una proteína anti-IgG de cerdo marcada con fluoresceína.

Es una técnica rápida, con elevada buena sensibilidad y especificidad, incluso en sueros hemolizados, jugo de carne y exudados de tejidos, (Gallardo y *col.*, 2014b; 2015a).

- **Inmunoperoxidasa indirecta (IPT)** (Pan y *col.*, 1982): al igual que la IFI, está basada en la unión de los anticuerpos específicos frente al vPPA a los virus presentes en un tapiz de

células Vero o MS infectadas con aislados adaptados a cada una de estas líneas celulares (Ba71VR adaptado a células Vero y E70MS adaptado a células MS), de modo que las células infectadas son utilizadas como antígenos. En este caso la reacción se revela por la acción de un conjugado de proteína A en presencia de sustrato.

Esta técnica, descrita en la década de los 80, no fue muy utilizada en el pasado hasta que en 2012 fue validada por el Laboratorio de Referencia de la UE de PPA. Se analizaron más de 2500 sueros de campo y experimentales, pertenecientes a los genotipos I, II, IX y X y exudados de tejidos, confirmando así su validez y utilidad como técnica alternativa para la detección de anticuerpos en muestras de suero y en exudado de tejidos, con valores de sensibilidad y especificidad comparables a ensayos de IB e IFI, ya que posee todas las características de esta última. Además puede ser utilizada para probar un gran número de sueros, ya que en cada análisis podemos testar hasta un máximo de 96 sueros (Gallardo y *col.*, 2012a; 2013).

Estudios realizados han puesto de manifiesto que la respuesta inmune humoral de anticuerpos específicos IgM se detecta a partir del día 4 y de IgG a partir de los 6-8 días post infección, pero no es hasta el día 12-14 dpi cuando pueden ser detectados por las técnicas prescritas por la OIE, el ELISA indirecto y el IB (Sánchez-Vizcaíno 1999; Gallardo y *col.*, 2009b, 2013). Sin embargo y tras la optimización de la técnica de la IPT, es posible obtener resultados positivos a tiempos más tempranos de infección, incluso a día 7-8pi.

Aunque el tiempo de aparición de los anticuerpos específicos sea variable dependiendo del aislado y ruta de infección, siempre existirá una correlación (un retraso) entre el ELISA (y el IB) frente a la IPT y la IFI, asociada a la mayor sensibilidad de estas técnicas frente a las primeras a tiempos tempranos de infección (Gallardo y *col.*, 2014b; 2015a; Mur y *col.*, 2014b).

Esta mayor sensibilidad frente al IB se ha comprobado a tiempos tempranos de infección: muestras negativas en ELISA presentan patrones de bandas inespecíficos, haciendo muy complicada su interpretación, mientras que el patrón de positividad en IPT (el citoplasma de la célula infectada teñido de rojo en muestras positivas o el tapiz blanco en muestras negativas) sí se mantiene en estas muestras (Gallardo y *col.*, 2014b).

Por último, otra de sus grandes ventajas es el tipo de muestras en distinto estado de conservación que pueden ser analizadas mediante la técnica de la IPT: sueros hemolizados, plasma sanguíneo y sangre entera, fluido oral, jugo de carne y exudados de tejidos, lo que nos permite obtener una información adicional muy útil acerca del curso de la infección en una zona, aunque sólo se reciban tejidos (Gallardo y *col.*, 2014b).

4.3. Epidemiología molecular (genotipado).

La infección por vPPA no induce anticuerpos neutralizantes y por tanto no es posible realizar la diferenciación entre las distintas cepas de virus basándose en serotipos y por ello, una vez se ha confirmado la presencia del vPPA, es necesario obtener información adicional acerca de su secuencia, para poder establecer un origen de la infección: un foco primario y su posterior propagación y crear así un mapa epidemiológico con la difusión de la enfermedad (Nix y *col.*, 2006).

El genotipado para caracterizar los aislados del vPPA se ha desarrollado recientemente, en la última década. Una primera clasificación se basa en el análisis de la secuencia parcial del extremo C-terminal del gen *B646L* que codifica para la proteína mayor de la cápside viral, la p72 y ha demostrado que permite diferenciar y clasificar aislados genéticamente diversos e incluirlos en uno de los 22 genotipos actualmente establecidos (Irusta y *col.*, 1996; Bastos y *col.*, 2003; Lubisi y *col.*, 2005; Boshoff, 2007).

Pese a ser de gran utilidad, esta primera clasificación no discrimina entre aislados más cercanos y esta diferenciación es esencial para determinar origen y evolución del virus, por lo que fue necesario analizar regiones alternativas que permitieran, una vez se ha llevado a cabo la primera clasificación, establecer diferencias entre cepas relacionadas. Diversos estudios llevados a cabo en la última década ofrecen un gran abanico de regiones que han probado su eficacia a la hora de subclasificar, aunque no siempre, aislados geográfica y cronológicamente relacionados (Nix y *col.*, 2006; Rowlands y *col.*, 2008; Gallardo y *col.*, 2009a, c; 2011a, b, c; 2014a; Giammarioli y *col.*, 2011; Malogolovkin y *col.*, 2012).

Entre estas herramientas podemos encontrar:

Las proteínas p54 y p30, codificadas por los genes *E183L* y *CP204L* respectivamente y empleadas con frecuencia para subclasificar virus muy relacionados (Rowlands y *col.*, 2008; Gallardo y *col.*, 2009a, c). En concreto, la p54 presenta variaciones en el número de tetrámeros de aminoácidos en sucesivos pases en cultivo celular, siendo esta variación en las repeticiones en tándem lo que le otorga la variabilidad en el tamaño y lo que le permite establecer subgrupos dentro del genotipo I, facilitando la diferenciación entre las cepas del oeste de África de los aislados europeos, también pertenecientes al genotipo I (Sun, 1995; Gallardo y *col.*, 2009a, c; 2011b, c).

Nix y *col.* en 2006 analizaron varias regiones, entre las que se incluyó el gen *B646L*, de aislados de los genotipos I, VII, VII y X de diversas localizaciones de Europa y África. En el análisis de la p72 no se encontraron diferencias en cuanto al tamaño de los amplicones, pero en ese mismo estudio sí aparecieron diferencias de tamaño entre distintos aislados al comparar: un fragmento situado en la región central variable del genoma (RCV), dentro del gen *B602L*, el gen *KP86R*, la región adyacente al *J268L* y la región situada entre los ORFs *E146L* y *E199L* (región Bt/Sj) que permitieron realizar la sub-clasificación de los virus estudiados.

Estas cuatro regiones están caracterizadas por presentar secuencias repetidas en tándem, de ellas, la más utilizada es la región central variable (RCV), codificada por el gen *B602L* y formada por repeticiones de doce pares de bases que codifican para cuatro aminoácidos que forman tetrámeros (Dixon y col., 1990; Almazán y col., 1995; Irusta y col., 1996; 24 Yañez y col., 1995). Éstos presentan variaciones tanto en número como en secuencia en los aislados de los 22 genotipos existentes (Irusta y col., 1996; Nix y col., 2006).

Trabajos posteriores confirmaron la capacidad de discriminación de la RCV revelándose como la región más útil para establecer diferencias, incluso en los aislados más cercanos (Bastos y col., 2004; Nix y col., 2006; Lubisi y col., 2005, 2007; Phologane y col., 2005; Gallardo y col., 2009a, c; 2011a, b, c y 2014a).

A raíz de estos estudios de distintas regiones del vPPA se ha establecido una secuencia de análisis reconocida internacionalmente que determinará el genotipado de los aislados del vPPA, basado en el análisis de tres regiones independientes (Manual de la OIE, 2015):

- el **extremo carboxi terminal de la proteína p72** codificada por el gen *B646L* que permite la clasificación de los aislados virales en los 22 genotipos (Boshoff y col., 2007).
- la **secuencia completa de la proteína p54** codificada por el gen *E183L* (Gallardo y col., 2009a).
- la **región central variable (RCV)** situada dentro del gen *B602L* (Nix y col., 2006; Gallardo y col., 2011b).

A pesar de todas estas herramientas disponibles para el análisis molecular de los distintos aislados y a la utilidad de la RCV para clasificar aislados a nivel de genotipo, en numerosas ocasiones esta información no es suficiente y se requiere información adicional para poder rastrear la propagación del virus, por lo que han seguido apareciendo nuevas regiones para analizar (Chapman y col., 2011; Gallardo y col., 2011a, c).

En 2012, Malogolovkin y col. analizaron muestras experimentales y de campo de distintas localizaciones dentro de la FR, recogidas de brotes ocurridos entre los años 2007 y 2011 y las analizaron con el fin de encontrar alguna diferencia molecular entre ellos. Para ello, además de amplificar las regiones incluidas en el genotipado convencional (p72, p54 y RCV) analizaron 6 regiones variables más, ricas en SRT: los genes *KP86R* y *I196L* y las regiones intergénicas (*I73R/I329R*, *I78R/I215L*, siguiendo los protocolos establecidos en el EURL. Una vez clasificados dentro del genotipo II no se encontró ninguna diferencia entre los aislados estudiados con ninguna de las regiones anteriormente mencionadas, ni en el tamaño de los amplicones obtenidos ni en la secuenciación de nucleótidos por lo que los aislados estudiados no pudieron ser subclasificados. Únicamente se pudieron incluir dentro del genotipo II de la p72.

4.4. Problemas resueltos en las técnicas de diagnóstico.

La mayoría de las técnicas de diagnóstico de la PPA incluyen a la proteína p72, bien como proteína antigénica, bien para amplificar una de las regiones del gen *B646L* que la codifica, por lo que aunque esta proteína se mantiene en todos los aislados del vPPA, se han detectado cambios tanto en la estructura antigénica, que podrían influir en los mecanismos de evasión de algunas subpoblaciones víricas, como genéticos, que son los que nos permiten clasificarlos (Zsak y col., 1993; Bastos y col., 2003; Boshoff y col., 2007). Por ello a raíz de la introducción del genotipo II en Georgia, surgió la duda de si las técnicas serológicas disponibles (basadas principalmente en aislados del genotipo I) detectarían con igual especificidad y sensibilidad los anticuerpos generados por aislados del genotipo II.

Gallardo y col. en 2013 demostraron que la sensibilidad y especificidad de los tests serológicos prescritos por la OIE, que utilizan antígeno semipurificado generados a partir de la cepa de referencia E70 (clasificado dentro de p72 genotipo I), no mejoran sustancialmente al sustituir este antígeno por otros generados a partir de cepas procedentes de diferentes fuentes geográficas (pertenecientes a los genotipos II, V, VII, IX y X) y enfrentar cada uno de estos nuevos antígenos a sueros de campo procedentes de zonas endémicas de África y Cerdeña y experimentales procedentes de animales infectados por virus pertenecientes a los genotipos I, II y X.

Estos resultados apoyan el argumento de que, aunque hay variabilidad genética en la secuencia de las proteínas antigénicas, la respuesta de anticuerpos se dirige contra un núcleo de epítomos, que son reconocidos independientemente de la cepa del virus y del polimorfismo antigénico en las proteínas inmunodominantes individuales (Kollnberger y col., 2002).

4.5. Algunos problemas a resolver.

Con su llegada a Europa en 2007 y su rápida difusión por los distintos países de Cáucaso y Rusia, la PPA, que había estado bastante olvidada por los Organismos e Instituciones competentes, ha vuelto a tener una gran relevancia, sobre todo desde 2014 con la aparición en países del Este de la UE, de modo que hoy el control y erradicación de la PPA es una prioridad para los países de la UE y en general existe una seria preocupación a nivel mundial.

Actualmente se están realizando importantes esfuerzos para aplicar las medidas necesarias que eviten la propagación del virus a otras regiones de la UE. Estas medidas aparecen recogidas en la directiva 2002/60/CE del Consejo de 27 de junio de 2002 por la que se *“establecen disposiciones específicas de lucha contra la peste porcina africana y se modifica, en lo que se refiere a la enfermedad de Teschen y a la peste porcina africana, la Directiva 92/119/CEE”*. Esta decisión de ejecución se refrendó en octubre del 2014 por la Decisión de Ejecución 2014/709/UE, a excepción de las prohibiciones relativas al transporte de animales vivos, canales y productos cárnicos, a las que plantea ciertas salvedades para *“evitar toda perturbación innecesaria del comercio dentro de la Unión y toda barrera injustificada al comercio de los terceros países”* y en la que se recogen y

aprueban los planes de erradicación en jabalíes planteados para Lituania y Polonia (2014/442/UE). Por otra parte, el anexo referido a las medidas de control zoonosanitarias relativas a la PPA relativas a las entradas en los países afectados de esta Decisión de Ejecución 2014/709/UE ha sido modificado a lo largo de 2015 con el fin de ir adecuándolo a los diferentes estatus sanitarios de las distintas regiones afectadas de Estonia, Letonia y Lituania. Hasta la fecha (Septiembre de 2015) las últimas decisiones de ejecución relativas a las entradas en Letonia aparecen recogidas en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/1405 de la comisión de 18 de agosto de 2015, mientras que las referentes a Estonia y Lituania aparecen recogidas en la Decisión de Ejecución (UE) 2015/1432 de la comisión de 25 de agosto de 2015.

Considerando las características propias de la PPA, los sistemas de vigilancia pasiva y aquellos basados en la vigilancia activa son claves para una detección temprana de la enfermedad, así como para el conocimiento de la evolución de la misma. Para ello es fundamental contar con laboratorios de análisis que realicen un diagnóstico rápido y fiable, empleando técnicas de análisis robustas, que permitan a la vez un diagnóstico diferencial de otras enfermedades hemorrágicas con sintomatología similar.

Por ello es necesario disponer de herramientas sensibles, específicas y reproducibles, de fácil manejo e interpretación y que puedan ser utilizadas con distintos tipos de muestras, por lo que resulta muy importante seguir trabajando en el desarrollo de nuevas técnicas de análisis que permitan obtener un buen resultado independientemente del tipo y calidad de las muestras.

La optimización de las técnicas para nuevos tipos de muestras, como pueden ser los exudados de tejidos, surge como clara necesidad a la llegada masiva de tejidos a los laboratorios principalmente de jabalí, al ser éste una importante fuente de transmisión en las áreas afectadas. La posibilidad de disponer de una técnica potente capaz de detectar anticuerpos específicos en dichas muestras, abre la posibilidad de obtener valiosa información epidemiológica, proporcionada por la presencia/ausencia de anticuerpos, acerca de la dinámica de la enfermedad, los tiempos de infección y el su patrón de virulencia del virus en el campo entre otros.

Por otra parte, es necesario continuar con estudios que permitan mejorar la trazabilidad de las notificaciones de enfermedad. Hasta el momento, las regiones estudiadas y aceptadas internacionalmente no permiten diferenciar entre los aislados circulantes en el este de Europa. Continuar con el análisis molecular de las regiones más variables del vPPA dentro de la región conservada podría abrir nuevas posibilidades que permitan establecer diferencias entre aislados geográfica y filogenéticamente relacionados, con el fin de poder dibujar mapas epidemiológicos más próximos a la realidad y con esta información establecer unas medidas de control y erradicación más eficaces, permitiendo identificar las áreas donde deben realizarse las actuaciones de forma preferente y priorizar aquellas medidas más ventajosas y favorables en virtud de los recursos económicos (Sánchez-Vizcaíno y Arias, 2012a).

OBJETIVOS

La PPA es una enfermedad que presenta una gran complejidad, tanto por las características del virus causante de la enfermedad, como por su epidemiología. Tras la aparición de la PPA en la región del Cáucaso en 2007, la enfermedad ha continuado su imparable expansión a los países vecinos de Armenia y Azerbaiyán, regiones del sur-oeste y central de la Federación Rusa Bielorrusia y Ucrania. En enero de 2014 la enfermedad se extendió a distintos países del este de la UE, donde hasta la fecha se han notificado más de 1000 focos en jabalí y en cerdo doméstico. Para poder lograr un control efectivo es fundamental conocer las características de los aislados circulantes y de la infección en el hospedador. Este conocimiento debería sustentarse en estudios moleculares, con fines de trazabilidad y estudios del comportamiento del patógeno en los distintos hospedadores, para identificar las formas clínicas que pudieran estar produciéndose, y adecuar los sistemas de detección y control. Esta información es posible obtenerla a través de la caracterización molecular de los aislados circulantes, de la experimentación “*in vivo*” con dichos aislados, y mediante estudios de investigación epidemiológica y diagnóstico. Las herramientas de detección diagnóstica juegan un papel esencial para el control de la PPA. Es fundamental contar con técnicas rápidas, sensibles, específicas y fiables, que permitan una detección temprana, a través de la identificación de la presencia del virus y de los anticuerpos específicos.

Por ello el objetivo principal de este trabajo doctoral ha sido estudiar la evolución de los aislados que se encuentran circulando en el Este de Europa (con especial énfasis en la UE) y una evaluación de la idoneidad de las herramientas diagnósticas disponibles, específicamente:

1. La caracterización de aislados circulantes del vPPA y su evolución en la epizootia del este de Europa.
 - 1.1 Caracterización biológica
 - 1.2 Caracterización molecular
2. Evaluación de las técnicas de diagnóstico de la PPA en los brotes epidémicos en el este de la UE.
 - 2.1. Empleo de muestras utilizadas en el diagnóstico habitual y nuevos tipos de muestras alternativas
3. Dinámica de la infección e interpretación de resultados.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CULTIVOS CELULARES.

1.1 Líneas celulares establecidas (Carrascosa y *col.*, 2011; De León y *col.*, 2013; ATTC, *American Type Culture Collection*):

1.1.1. Células Vero (VR; ATCC: CCL 81): células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Se utilizaron para la producción y titulación del aislado del vPPA Ba71 adaptado a esta línea celular y en la preparación de las placas de la IPT.

1.1.2. Células “monkey stable” MS (ECACC 91070510): células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) utilizadas en la producción y titulación del aislado del vPPA E70 adaptado a esta línea celular, en la preparación de las placas de la IPT y en la producción del antígeno soluble citoplasmático del vPPA (Ag-CP) empleado en las técnicas de diagnóstico serológico prescritas por la OIE (Manual de la OIE, 2015).

El cultivo y mantenimiento celular se realizó mediante el protocolo estandarizado de tripsinización (Trypsina-EDTA, Lonza) en frascos de cultivo de 175cm² (Falcon T175) a 37°C en una atmósfera humidificada con 5% de CO₂ utilizando:

- **Células Vero;** medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco con 4,5g/l de glucosa (DMEM, Bio-Whittaker), suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Bio-Whittaker), 1% de glutamina 4mM (Bio-Whittaker), 1% piruvato sódico (Bio-Whittaker), 0,05 mg/ml de sulfato de gentamicina (Bio-Whittaker), 13 U/ml de nistatina (Gibco) y un 10% de suero fetal bovino (Linus) inactivado por calor (SFBi; 30min a 56°C).
- **Células MS;** medio mínimo esencial de Eagle (EMEM, Bio-Whittaker), suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales Bio-Whittaker), 1% de glutamina 4mM (Bio-Whittaker), 0.05 mg/ml de sulfato de gentamicina (Bio-Whittaker) y un 10% de suero de cerdo filtrado o 10% SFBi dependiendo del uso.

1.2. Cultivos primarios porcinos.

Utilizados para el aislamiento, producción y titulación de los aislados del vPPA (Malmquist 1960; Carnero y *col.*, 1967; Carrasco y *col.*, 1996b; Galindo y *col.*, 2000; Carrascosa y *col.*, 2011; Manual de la OIE, 2015, capítulo 2.8.1):

1.2.1. Leucocitos porcinos obtenidos a partir de sangre periférica de cerdo donante según el procedimiento descrito en el capítulo 2.8.1 del Manual de la OIE (OIE, 2015b) y en los procedimientos normalizados de trabajo (PNT), para el diagnóstico de la PPA del laboratorio de referencia de la UE de PPA (EURL):

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PNTs/PNT_PPA_VI_1.pdf

1.2.2. Macrófagos alveolares porcinos (MAP): obtenidos mediante lavado bronco-alveolar de los pulmones de cerdo donante según el procedimiento el capítulo 2.8.1 del Manual de la

OIE (OIE; 2015b) y en los PNTs para el diagnóstico de la PPA del laboratorio de referencia de la UE de PPA (EURL):

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_VI_2.pdf

2. AISLADOS VIRALES.

2.1. Utilizados en los estudios de experimentación animal.

Para la realización de los estudios de experimentación animal se seleccionaron 3 aislados pertenecientes al genotipo II de la p72 del vPPA;

2.1.1. Arm07: aislado obtenido después de 3 pases (Arm07-L3) en cultivos primarios porcinos a partir de bazo de cerdo doméstico recibido en el EURL proveniente de los brotes de PPA que tuvieron lugar el 7 de agosto del 2008 en Armenia, en Dilijan, a 50 km de las fronteras con Georgia y con Azerbaiyán.

2.1.2. Ukr12/Zapo: aislado obtenido después de 2 pases (Ukr12/Zapo-L2) en cultivos primarios porcinos a partir de bazo de cerdo doméstico proveniente de los brotes de PPA que tuvieron lugar el 30 de julio del 2012 en Ucrania, en la región de Zaporozhye, distrito de Primorsky, en las orillas del mar de Azov.

2.1.3. LT14/1490: aislado obtenido después de 2 pases (LT14/1490-L2) en cultivos primarios porcinos a partir de bazo de jabalí europeo proveniente de los brotes de PPA que tuvieron lugar el 21 de enero del 2014 en Lituania, en la región de Salcininkai, en Varena a 5km de la frontera con Bielorrusia.

2.2. Utilizados en la producción de reactivos y material de referencia.

2.2.1. E70: Aislado virulento español perteneciente al genotipo I de la p72 obtenido en cultivos primarios de leucocitos porcinos a partir del bazo de cerdo doméstico de los brotes de PPA que tuvieron lugar en Villagarcía de Arousa, Pontevedra en 1970. Aislado de referencia disponible en la colección de aislados del vPPA del INIA-CISA.

2.2.2. E70 adaptado a células MS (E70MS): Aislado derivado del aislado virulento español E70 adaptado a crecer en células MS mediante 81 pases sucesivos en estas células. Los clones generados a partir de este pase 81 (E70-MS81) se han utilizado como aislado adaptado a células MS: E70MS (Rodríguez y col., 1994).

2.2.3. Ba 71 adaptado a células VR (Ba71VR): Aislado derivado del aislado virulento español Ba71 obtenido de cerdo doméstico en Badajoz 1971, adaptado a crecer en células Vero mediante 140 pases consecutivos (Enjuanes y col., 1976).

3. PRODUCCIÓN Y TITULACIÓN DE AISLADOS DEL vPPA.

3.1. En cultivos primarios.

Los aislados del vPPA descritos en los apartados 2.1 y 2.2.3 se obtuvieron mediante la realización de pases consecutivos (2-3) en cultivo primario de leucocitos porcinos de sangre periférica o de MAP, según los PNTs descritos por el EURL. Brevemente, frascos de cultivo T25 con una concentración final de $8-10 \times 10^6$ células/ml se inocularon a una dilución 1/10 (volumen final 10 ml) con los aislados obtenidos (puntos 2.1 y 2.2.3.) y se incubaron a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 durante 1 semana. Después de 3 ciclos de congelación y descongelación rápidas, los cultivos primarios infectados se centrifugaron a 1.050g durante 10 minutos, recogiendo los sobrenadantes para su posterior titulación. La titulación de los aislados virales se realizó mediante la técnica de la Hemoadsorción (HAD). Para ello, placas de cultivo celular de 96 pocillos de fondo plano [NUCLONTM "Surface, NUNC]. Con una concentración de 300.000 células por pocillo se inocularon con diluciones seriadas en base 10 (desde 10^{-1} hasta 10^{-12}) de los aislados virales producidos. Para realizar la técnica de la HAD, se añadió un 10% de solución de eritrocitos porcinos. Las placas se mantuvieron 1 semana a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 , leyéndolas diariamente para comprobar la aparición del HAD. El título viral se calculó mediante el algoritmo descrito por Spearman y Kärber (1996), expresándose como el 50% de unidades hemoadsorbentes por ml ($\text{UHAD}_{50}/\text{ml}$).

3.2. En líneas celulares establecidas.

Los aislados del vPPA descritos en los apartados 2.2.1 y 2.2.2 se obtuvieron mediante la inoculación del cultivo celular correspondiente a cada uno de los aislados, y se titularon según el PNT descrito por el laboratorio de referencia de la UE de PPA (EURL)

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_TITULACION_1.pdf

Muy brevemente, frascos de cultivo T150 confluentes al 80% ($1,5 \times 10^6$ células) se inocularon con una multiplicidad de infección (m.o.i.) de 10 y se incubaron a $37 \pm 3^\circ\text{C}$ en atmósfera de CO_2 durante 2-3 días (E70MS) y 4-5 días (Ba71VR).

Después de 3 ciclos de congelación y descongelación, las células infectadas se centrifugaron a 1.050g durante 10 minutos recogiendo los sobrenadantes para su posterior titulación, que se realizó mediante diluciones seriadas en base 10 (desde 10^{-1} hasta 10^{-12}) en placas de placas de cultivo de 96 pocillos de fondo plano.

El título viral se calculó mediante el algoritmo descrito por Spearman y Kärber (1996), expresándose la concentración en dosis infectivas por ml ($\text{TCID}_{50}/\text{ml}$).

En el caso del aislado E70MS destinado a producción de antígeno soluble citoplasmático (Ag-Cp) para el tapizado de las placas del ELISA indirecto (ELISA-OIE) y la producción de las tiras de IB (IB-OIE) no se llevaron a cabo los ciclos de congelación y descongelación. Las células se recogieron y se centrifugaron 20 min a 1.050g descartando en este caso, el sobrenadante.

4. INFECCIONES EXPERIMENTALES.

4.1. Animales.

Tanto para la obtención de cultivos primarios de macrófagos y leucocitos como para las infecciones experimentales se emplearon cerdos domésticos (*Sus scrofa domesticus*) híbridos Landrace x Large White.

Todos ellos se adquirieron en granjas destinadas a la cría de animales para la experimentación y fueron estabulados en el Centro de Investigación en Sanidad Animal (INIA-CISA) en un nivel de bioseguridad 3, siguiendo la normativa europea referente a confinamiento, alimentación y cuidado de animales de experimentación.

Todos los procedimientos de trabajo fueron aprobados por el Comité de Ética del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias y Agroalimentarias (INIA) de acuerdo con el Real Decreto Español (RD1201/2005 y RD53/2013), las normas internacionales de la Unión Europea 2010/63/UE y la ley española 32/2007 sobre la protección y el manejo de los animales de experimentación.

4.2. Diseño experimental.

4.2.1. Infección experimental con el aislado Arm07.

Infección realizada en 2009 en la que se utilizaron un total de 6 animales alojados en 1 box. Los animales fueron identificados individualmente a través de un autocrotal numerado en el momento del ingreso a las instalaciones. Cuatro de ellos fueron inoculados por vía intramuscular (i.m.) con 10 UHAD₅₀ del aislado del vPPA Arm07 y los dos restantes se mantuvieron como cerdos contacto con el fin de estudiar la infección por contacto directo.

Los animales fueron diariamente examinados realizándose la valoración clínica incluida la toma de temperatura rectal. Previo al inicio del experimento y antes de la inoculación (día 0), se obtuvieron muestras de sangre completa con anticoagulante (sangre-EDTA) y suero de todos los cerdos para constatar su condición de negativos al vPPA. Una vez inoculados se recogieron muestras de sangre-EDTA y suero a los días 5, 9, 12, y 15 post inoculación/post contacto, y el día de la necropsia del animal si éste hubiera sido sacrificado por motivos humanitarios.

En la necropsia de cada uno de los animales se realizó el examen *post-mortem* con el fin de valorar las lesiones y se recogieron hasta un total de quince tejidos diferentes, que incluyeron: hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, tonsila, piel de oreja y los ganglios linfáticos retro-faríngeo, renal, mesentérico y gastro-hepático además de los tejidos articulares anterior y posterior derecho e izquierdo.

4.2.2. Infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo.

En esta infección, llevada a cabo en 2012, se utilizaron un total de 6 cerdos domésticos distribuidos en 1 box. Los animales fueron identificados individualmente a través de un autocrotal

numerado al momento del ingreso a las instalaciones. Cuatro de ellos fueron inoculados por vía i.m con 10 UHAD₅₀ del vPPA Ukr12/Zapo y los dos restantes se mantuvieron como cerdos contacto de la infección.

Los animales fueron objeto de un seguimiento clínico diario e individualizado. La valoración clínica se realizó mediante la evaluación de la severidad, expresada mediante una puntuación del 0 al 3, de cada uno de los ocho síntomas clínicos que aparecen descritos en la **tabla II**, considerando:

- 0= NO DESTACABLE
- 1= LEVE
- 2 =MODERADO
- 3 = SEVERO

Tabla II→ Síntomas clínicos considerados para analizar la evolución de la enfermedad en la infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo.

1. Anorexia	0.	sin anomalías
	1.	leve (apetito disminuido)
	2.	moderada (ingestas puntuales)
	3.	severa (no se alimenta >48h)
2. Postración	0.	sin anomalías
	1.	leve (letargo)
	2.	moderada (postración, aislamiento)
	3.	severa (no se levanta >24h)
3. Hemorragias en piel/Cianosis	0.	sin anomalías
	1.	leve
	2.	moderada
	3.	severa
4. Inflamación de las articulaciones	0.	sin anomalías
	1.	leve (inflamación)
	2.	moderada (cojera, focos necróticos)
	3.	severa (cojera severa, dificultad al andar >24h)
5. Síntomas respiratorios	0.	sin anomalías
	1.	leve (tos puntual)
	2.	moderada (tos continuada)
	3.	severa (dificultad al respirar >24h)
6. Descarga ocular	0.	sin anomalías
	1.	leve
	2.	moderada
	3.	severa >24h
7. Síntomas digestivos	0.	sin anomalías
	1.	leve (diarrea<24h)
	2.	moderada (diarrea, vómitos >24h)
	3.	severa sangre en orina y heces>48 h
8. Temperatura	0.	<40
	1.	40-40,5
	2.	40,5-41,5
	2,5.	41-41,5
	3.	>41,5

Previo al inicio del experimento y antes de la inoculación (día 0) se obtuvieron muestras de sangre-EDTA y suero de todos los cerdos para constatar su condición de negativos al VPPA. En el momento de la inoculación se obtuvieron muestras de sangre-EDTA y suero a los días 4, 8 y 11 post-inoculación/post contacto y el día de la necropsia del animal si éste hubiera sido sacrificado por motivos humanitarios.

En la necropsia de cada uno de los animales además de la evaluación de las lesiones, se recogieron hasta un total de quince tejidos diferentes, que incluyeron: hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, tonsila y los ganglios linfáticos retro-faríngeo, renal, mesentérico, sub-mandibular, esplénico, mediastínico, poplíteo, inguinal y gastro-hepático.

4.2.3. Infección experimental con el aislado LT14/1490.

Llevada a cabo en 2014 con total de 18 animales alojados en 3 boxes. Ocho de ellos fueron inoculados por vía i.m. con 10 UHAD₅₀ del aislado vPPA LT14/1490. El resto de los animales (10) se utilizaron como contacto de la infección permaneciendo alojados en el mismo box que los inoculados. Los animales fueron objeto de un seguimiento clínico diario e individualizado durante todo el transcurso del experimento. La valoración clínica se realizó según lo descrito en el apartado 4.2.2, **tabla II**.

Se recogieron muestras clínicas de sangre completa y suero dos veces por semana comenzando el día 3 post inoculación/contacto y hasta la muerte o sacrificio del animal. Para constatar la condición de negativos al vPPA se recogieron muestras de sangre y suero antes de la inoculación (día 0).

En el momento de la necropsia de cada uno de los animales se realizó el examen *post-mortem* con el fin de evaluar las lesiones relacionadas con la enfermedad. Asimismo se recogieron hasta un total de 20 tejidos diferentes que incluyeron: hígado, bazo, riñón, pulmón, corazón, tonsila, ganglios linfáticos sub-mandibular, retro-faríngeo, inguinal, poplíteo, mesentérico, mediastínico, renal, gastro-hepático y esplénico, médula ósea, y tejidos articulares. En los casos en los que fue posible se recogió líquido de la cavidad articular y líquido ascítico de la cavidad peritoneal.

5. MUESTRAS ANALIZADAS.

5.1. Muestras experimentales.

Muestras de cerdo doméstico obtenidas de las tres infecciones experimentales descritas en el punto 4.2 (“Arm07”, “Ukr12/Zapo” y “LT14/1490”) que sumaron un total de 150 muestras pareadas de suero y sangre con EDTA recogidos a intervalos regulares así como un total de 450 tejidos de un total de 30 animales infectados.

5.2. Muestras de campo.

Desde el año 2012 hasta el 10 de Agosto del 2015 se recibieron en el EURL-PPA un total de **663 muestras de 367 animales**, incluyendo 85 cerdos domésticos (22,49%) y 284 jabalíes europeos (80,4%) (**tabla III**) procedentes de los brotes que tuvieron lugar en Ucrania (2012, 2015), Bielorrusia (2013), Polonia (2014, 2015), Lituania (2014, 2015), Letonia (2014, 2015) y Estonia (2014, 2015).

Tabla III→ Número de animales recibidos por país y año.

PAÍS	AÑO	NÚMERO TOTAL DE ANIMALES ANALIZADOS/PAÍS				
		Nº total	Cerdo doméstico		Jabalí europeo	
			Nº	%	Nº	%
UCRANIA	2012 y 2015	3	3	100%	-	-
BIELORRUSIA	2013	3	3	100%	-	-
POLONIA	2014-2015	75	11	14,67%	64	85,30%
LITUANIA	2014-2015	136	21	15,44%	115	84,60%
LETONIA	2014-2015	53	26	49,06%	27	51%
ESTONIA	2014-2015	97	19	19,59%	78	80,40%
TOTAL	2012-2015	367	83	22,49%	284	77,51%

Las muestras recibidas comprendieron muestras de suero (66), sangre (76), tejidos (369), fluidos (41), ácidos nucleicos (107) y exudados de tejidos (4), tal y como se puede ver desglosado por años y países en la **tabla IV**.

Tabla IV→ Descripción del número y tipo de muestras analizadas por país y año.

PAÍS	AÑO	Nº TOTAL DE MUESTRAS	TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS					
			Suero	Sangre	Tejidos	Fluidos	ADN	Exudados
UCRANIA	2012 y 2015	3	1	-	2	-	-	-
BIELORRUSIA	2013	3	-	-	3	-	-	-
POLONIA	2014-2015	259	5	24	126	1	103	-
LITUANIA	2014-2015	161	13	44	100	4	-	-
LETONIA	2014-2015	116	27	7	78	-	-	4
ESTONIA	2014-2015	121	20	1	60	36	4	-
TOTAL	2012-2015	663	66	76	369	41	107	4

El tipo de tejidos recibidos fue principalmente bazo (34%) y médula ósea (21%) (**tabla V**).

Tabla V→ Desglose del tipo de tejidos recibido en el EURL.

TIPO DE TEJIDO	JABALÍ EUROPEO		CERDO DOMÉSTICO		TOTAL	
	nº	%	nº	%	nº	%
Bazo	96	33	28	35	124	34
Riñón	39	13	14	18	53	14
Pulmón	21	7	6	8	27	7
Ganglios linfáticos	17	6	10	13	27	7
Tonsila	13	4	7	9	20	5
Médula ósea	77	27	0	0	77	21
Hígado	4	1	0	0	4	1
Pooles órganos	3	1	3	4	6	2
Otros*	20	7	11	14	31	8
TOTAL	290		79		369	

*muestras recibidas de piel, hueso, músculo esquelético y tejidos sin identificar.

5.2.1. Tratamiento de las muestras (Manual de la OIE, 2015, capítulo 2.8.1): El procesamiento de las muestras obtenidas de tejidos y sangre para su posterior análisis mediante las técnicas de diagnóstico del vPPA, aplicables tanto a las técnicas de detección de anticuerpos como a las técnicas de detección de genoma, antígenos virales o el virus, se realizó siguiendo el PNT establecido en el EURL-PPA:

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_MUESTRAS_1.pdf

Los exudados de los tejidos se obtuvieron recogiendo la fracción de líquido intersticial acumulado en el fondo del continente de cada uno de los tejidos. Si la cantidad no fue suficiente, los tejidos se mantuvieron a 37°C durante 1h o se congelaron a -70°C para posteriormente descongelarlos a 37°C.

Todas las muestras se alicuotaron y se conservaron a 4°C para su uso inmediato y a -70°C para su almacenaje.

5.3. Muestras seleccionadas para el análisis comparativo de las técnicas de diagnóstico de la PPA.

En el estudio se analizaron **un total de 1274 muestras** tanto experimentales como de campo. Se incluyeron **314 muestras de campo** de 125 animales, que comprendieron 91 jabalíes europeos y 34 cerdos domésticos, recogidas durante los brotes ocurridos en 2014 en los países afectados del este de la UE -Letonia, Lituania, Polonia y Estonia.

De las 211 muestras analizadas de jabalí, 182 fueron tejidos, fundamentalmente bazo (32,2%) y médula ósea (21,3%), 22 sangres, 5 sueros y 2 muestras de fluido de la cavidad peritoneal. De las 103 muestras analizadas de cerdo doméstico, 70 fueron muestras de tejidos, siendo el bazo el tejido predominante (40%), 17 fueron muestras de sangre y 16 de suero.

También se incluyeron **750 muestras de cerdo procedentes de las infecciones experimentales** descritas en el punto 4 (**tabla VI**). De ellas, 150 fueron muestras pareadas de suero y sangre obtenidas a distintos días post infección y 450 fueron tejidos obtenidos de dichos animales el día de la necropsia. Por último, se analizaron 210 exudados de tejidos negativos obtenidos de 70 animales negativos al vPPA.

Tabla VI → Descripción de las muestras experimentales obtenidas de cerdos domésticos infectados con los aislados del vPPA del genotipo II.

AISLADO DEL vPPA	Nº DE ANIMALES	DÍAS POST INOCULACIÓN/ CONTACTO	TIPO DE MUESTRAS ANALIZADAS		
			TEJIDOS	SANGRE	SUEROS
Arm07	6	0-16	90	20	20
Ukr12/Zapo	6	0-14	90	19	19
LT14/1490	18	0-61	270	111	111
TOTAL MUESTRAS ANALIZADAS			450	150	150

5.3.1. Muestras seleccionadas para el estudio comparativo de las técnicas de diagnóstico virológico.

Para realizar el estudio comparativo de las técnicas de PCR para la detección del genoma del vPPA, (punto 6.1.1.) se seleccionaron un total de **895 muestras de sangre y tejidos**, que comprendieron: 295 muestras de campo (252 muestras de tejidos, 39 de sangre, 2 de suero y 2 de fluido) y 600 muestras obtenidas de las infecciones experimentales (150 muestras de sangre y 450 muestras de tejido).

Además, 272 muestras de sangre y tejido se analizaron en paralelo utilizando el ELISA de antígeno comercial descrito en el punto 6.1.3 (Ingenasa-Ingezim PPA DAS K2; Ingenasa, Madrid, España). Éstas incluyeron 92 muestras de campo (67 de bazo y 25 de sangre de un total de 79 animales), y 180 experimentales, obtenidas a partir de 30 bazos y 150 sangres de un total de 30 cerdos domésticos.

5.3.2. Muestras seleccionadas para el estudio comparativo de las técnicas de diagnóstico serológico.

Inicialmente se seleccionaron 150 sueros experimentales obtenidos de las infecciones experimentales (**tabla VI**) y 21 sueros de campo (16 de cerdo doméstico y 5 de jabalí). Los sueros se analizaron en paralelo utilizando todas las pruebas de detección de anticuerpos descritas en el punto 6.2, a excepción del IB.

En el estudio de evaluación **de detección de anticuerpos en muestras alternativas de sangre y exudados**, se incluyeron inicialmente 90 muestras de exudados de bazo, hígado y pulmón procedentes de las infecciones experimentales (6 animales en las infecciones de Arm07 y Ukr12/Zapo y 18 en el caso de la infección con el aislado LT14/1490). Para determinar la especificidad de los resultados obtenidos se incluyó un panel de 210 exudados negativos al vPPA (bazo, pulmón e hígado) obtenidos de 70 animales no infectados por el virus. Las muestras fueron analizadas en paralelo mediante las técnicas de ELISA y de IPT descritas en el apartado 6.2. Finalmente mediante la técnica de IPT se analizaron 167 muestras de campo obtenidas en 2014 de animales infectados en zonas de de la UE y que incluyeron 140 exudados de tejidos, 26 muestras de sangre y una muestra de fluido.

6. TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO DEL VPPA.

6.1. Técnicas de diagnóstico virológico.

6.1.1. Detección del genoma del VPPA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

6.1.1.1. Extracción de ADN genómico: Procedimiento empleado para extraer el ADN genómico que servirá de molde para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, punto 6.1.1), utilizando el kit de extracción “High Pure PCR Template Preparation” Kit (Roche Diagnostics GmbH, Roche Applied Science, Mannheim, Germany) según las especificaciones del fabricante con modificaciones menores descritas en el PNT del EURL-PPA: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_EXTRACCIN_ADN.pdf

6.1.1.2. PCR convencional OIE-PCR (Agüero y col., 2003; Manual de la OIE, 2015, capítulo 2.8.1): técnica de PCR convencional descrita en el Manual de la OIE como técnica de

referencia. Está basada en la amplificación específica de una región altamente conservada del genoma viral dentro de la región 72. Los cebadores PPA-1 (5'-AGTTATGGGAAACCCGACCC-3') y PPA-2 (5'-CCCTGAATCGGAGCATCCT-3') amplifican un fragmento de ADN de 257 pares de bases (pb) a partir del ADN extraído (punto 6.1.1.1) en muestras de suero, sangre (con EDTA), homogeneizados de tejidos y sobrenadantes de cultivo celular. El producto amplificado es visualizado en geles de agarosa mediante tinción con bromuro de etidio (BrEt 0.625mg/ml, Amresco) bajo luz U.V.

La técnica se ha realizado siguiendo el PNT del EURL; http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_1.pdf y se consideró válida siempre que en los controles positivos de extracción y reacción se visualizó una banda que se corresponde con un tamaño de amplicón de 257pb y en los controles negativos de reacción y extracción no se visualizó ninguna banda.

6.1.1.3. PCRs en tiempo real (King y *col.*, 2003; Fernández-Pinero y *col.*, 2013 y Manual de la OIE 2015, capítulo 2.8.1): procedimiento realizado para la detección y amplificación de un fragmento del genoma del vPPA mediante la PCR en tiempo real en muestras de suero, sangre (con EDTA), homogeneizados de tejidos sobrenadantes de cultivo celular. Simultáneamente a la amplificación del ADN y gracias a la incorporación de sondas marcadas con fluorocromos en la mezcla de reacción permite realizar un análisis cuantitativo del producto amplificado presente en una muestra. Los fluoróforos emitirán una fluorescencia de forma proporcional a la producción del amplicón que será recogida por el equipo en cada uno de los ciclos de replicación de modo que al final de la PCR obtendremos una representación en forma de curva sigmoidea construida con cada uno de los datos recogidos por el equipo, que además nos dará un valor de Ct ("cycle threshold" o ciclo umbral) para cada una de las muestras problema. Este valor es inversamente proporcional a la cantidad de ADN presente en la muestra analizada.

En el desarrollo de esta tesis se emplearon dos procedimientos de PCR en tiempo real que se realizaron utilizando un equipo de placa de 96 pocillos MX3005P (Stratagene, Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA). Las dos técnicas empleadas fueron.

- **OIE-PCR en tiempo real** (King y *col.*, en 2003; OIE, 2015b), basado en el uso de la sonda Taqman según el protocolo descrito en: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_2.pdf
- **UPL-PCR en tiempo real** (Fernández-Pinero y *col.*, en 2013) basado en el uso de una sonda universal UPL#162 ("Universal Probe Library"-ROCHE) según el protocolo descrito en: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_3.pdf

Ambos métodos están basados en la detección de una región conservada del genoma del vPPA dentro del gen que codifica para la proteína p72. La secuencia de los cebadores y las sondas empleadas así como sus principales características aparecen descritas en la **tabla VII**.

Tabla VII → Características de las sondas y cebadores empleados en las PCRs en tiempo real.

MÉTODO	Sondas y cebadores	SECUENCIA 5'→3'	Tamaño amplicón
OIE-PCR	King -S	5'-CTGCTCATGGTATCAATCTTATCGA-3'	250pb
	King -A	5'-GATACCACAAGATCRGCCGT-3'	
	Sonda Taqman	5'-FAM- CCACGGGAGGAATACCAACCCAGTG-TAMRA-3	
UPL-PCR	ASF-VP72-F	5'-CCCAGGGRGATAAAATGACTG-3'	68pb
	ASF-VP72-R	5'-CACTRGTTCCCTCCACCGATA-3'	
	Sonda UPL#162	5'-6FAM-GGCCAGGA-dark quencher-3'.	

Los procedimientos se consideraron válidos siempre que los Ct obtenidos para los controles positivo de extracción y de reacción presentaron valores de 32 ± 4 y los negativos no dieron ningún valor de Ct. Las muestras se clasificaron como positivas cuando se obtuvo una curva de amplificación sigmoidea y un valor de Ct < 40 y negativas cuando mostraron valores de Ct ≥ 40 . En las muestras en las que se obtuvo un valor de Ct > 38 con curva sigmoidal se consideraron dudosas y el análisis se repitió para confirmar el resultado. Sin embargo las muestras con valor de Ct > 38 se consideraron negativas si la curva de amplificación presentó forma lineal.

6.1.1.4. Controles empleados en las técnicas de PCR. En cada uno de los ensayos de PCR se incluyeron controles positivos y negativos de extracción y de reacción para garantizar el buen funcionamiento de los procesos de extracción y amplificación y descartar la presencia de contaminantes.

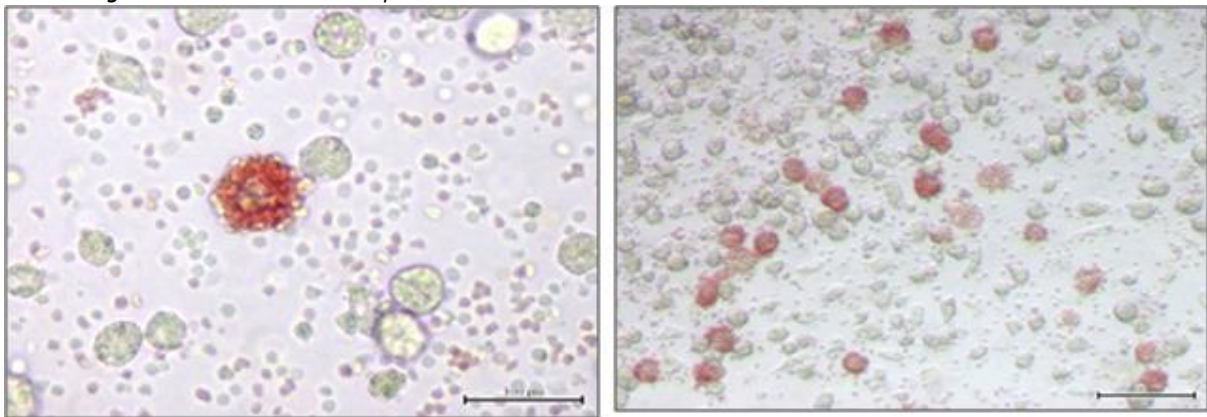
Los controles empleados fueron los siguientes:

- ⇒ Control positivo extracción → Dilución 10^{-4} en suero negativo de cerdo donante del aislado del vPPA E70 con título 1×10^{11} UHAD₅₀/ml. Producido y titulado en cultivo primario de leucocitos (punto 3.1.), positivo en la PCR convencional prescrita por la OIE y con valores de $28 \leq Ct \leq 3$ en las PCRs en tiempo real.
- ⇒ Control positivo reacción → ADN extraído del control positivo de reacción (E70, dilución 10^{-4}), positivo en la PCR convencional prescrita por la OIE y con valores de $28 \leq Ct \leq 3$ en las PCRs en tiempo real.
- ⇒ Control negativo → agua libre de ARNasas.

6.1.2. Aislamiento viral.

Realizado en cultivos primarios (punto 1.2) y basado en la capacidad del vPPA de infectar y replicarse en dichos cultivos en los que, además de producir un efecto citopático (ECP) en las células infectadas, origina un efecto de hemoadsorción (HAD). Los glóbulos rojos se quedan adheridos a los leucocitos que han sido infectados por el vPPA, de modo que al microscopio se observa una imagen con forma de mórula o roseta de eritrocitos alrededor de los leucocitos (figura 12).

Figura 12 → Hemoadsorción típica del vPPA.



El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo con los protocolos incluidos en la página web del EURL para aislamiento viral:

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PNTs/PNT_PPA_VI_1.pdf en leucocitos

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_VI_2.pdf en MAP.

Muy brevemente, los cultivos primarios procesados según lo descrito en el punto 1.2. fueron inoculados a una dilución 1/10 con las muestras problema previamente tratadas (apartado 5.2.1.). Para valorar el efecto hemoadsorbente se añadió la misma cantidad de una solución de eritrocitos diluida al 1/100. Las placas se incubaron a $37\pm3^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 durante 1 semana comprobando diariamente la aparición del ECP y/o de HAD. En cada lote de placas se incluyeron un mínimo de cuatro pocillos sin inocular (control negativo) y cuatro pocillos inoculados con un control positivo para garantizar el buen funcionamiento de la técnica. Como control positivo se utilizó el aislado del vPPA E70, producido y titulado en cultivo primario de leucocitos (punto 3.1.).

En caso de un resultado negativo en HAD, la muestra se sub-inoculó en un nuevo cultivo de leucocitos hasta completar un ciclo de tres inoculaciones (tres pases consecutivos). Tras cada uno de los pases se realizó una PCR en tiempo real del sedimento celular para comprobar si la cantidad de ADN presente en la muestra se incrementaba o no (indicando crecimiento viral) conforme se daban los pases.

6.1.3. **ELISA de Antígeno (Ingezim PPA DAS 11.PPA.K2, Ingenasa, Madrid, España).**

Para la detección de antígenos virales del vPPA en sangre y tejidos se utilizó el ELISA comercial de captura de doble anticuerpo, que emplea anticuerpos monoclonales específicos frente a la proteína 72 del vPPA. El procedimiento se realizó siguiendo las especificaciones descritas por la casa comercial. Las muestras se analizaron sin diluir y en una dilución 1/10 de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Una vez terminado el ensayo y comprobada su validez, todas las muestras con valores de absorbancia $>0,300$ se consideraron muestras positivas, mientras que aquellas que presentaron valores de absorbancia $<0,15$ se consideraron negativas.

Las muestras cuyos valores de absorbancia estuvieron comprendidos en el rango del punto de corte (0,15 y 0,3) se consideraron muestras dudosas.

6.2. **Técnicas de diagnóstico serológico.**

6.2.1. **Técnicas de cribado (ELISA):** empleadas en un primer análisis en la detección de anticuerpos frente al vPPA.

6.2.1.1. **ELISA-OIE** (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 1979, 1982; Rosell y *col.*, 1986; Escribano y *col.*, 1989; Pastor y *col.*, 1990; Arias y *col.*, 1993; Gallardo y *col.*, 2013; Manual de la OIE, 2015, capítulo 2.8.1): Es la técnica prescrita para el comercio internacional por la OIE en el Manual de las Pruebas Diagnósticas y de las Vacunas para los Animales Terrestres. Es un ELISA indirecto basado en la unión específica entre los anticuerpos y el antígeno soluble citoplasmático del vPPA (Cp-Ag) obtenido a partir del aislado E70 MS, semipurificado en colchón de sacarosa y fijado posteriormente a un soporte inmunoabsorbente.

La técnica se realizó conforme a lo descrito en el PNT incluido en la página web del EURL:

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_ELISA_1-2014.pdf

Muy brevemente, las placas se tapizaron con el Cp-Ag obtenido según el protocolo de semipurificación descrito en:

[http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_CISA_PPA_AG\(1\).pdf](http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_CISA_PPA_AG(1).pdf) y se

añadieron los sueros problema sobre al antígeno fijado. Si los sueros presentan anticuerpos frente al vPPA, el complejo antígeno –anticuerpo quedará inmovilizado sobre el soporte de modo que tras añadir un anticuerpo secundario marcado se obtendrá una reacción colorimétrica, fácilmente medible mediante un espectrofotómetro. Así, la presencia de color indica anticuerpos específicos frente al vPPA en el suero problema y la ausencia de color, ausencia de anticuerpos. El ensayo se consideró válido siempre que el valor de la densidad óptica (DO) media de los pocillos del control positivo (CP) fuese al menos 4 veces el valor de la DO media de los pocillos del

control negativo (CN), teniendo en cuenta que la DO media del CP $\geq 1,0$ y la DO media del CN $\leq 0,250$. Una vez determinada la validez del ensayo las muestras se clasificaron en positivas, dudosas o negativas determinado el valor del punto de corte (CO) mediante la siguiente fórmula:

$$CO = DO \text{ media CN} + [DO \text{ media CP} \times 0,2]$$

- ⇒ Todos los sueros con valores de absorbancia por debajo del CO - 0,1 se consideraron sueros negativos.
- ⇒ Todos los sueros con valores de absorbancia por encima del CO + 0,1 se consideraron sueros positivos.
- ⇒ Todos los sueros con valores de absorbancia comprendidos en el rango CO - 0,1 \leq DO muestra \leq CO + 0,1 se consideraron sueros dudosos.

Como **controles** se utilizaron:

- Control positivo (CP) → Suero hiperinmune de animales infectados con el vPPA con lecturas de densidad óptica (DO 620nm) superiores a 1,0 a los 10 min de revelado.
- Control límite (CL) → Dilución 1/32 de suero hiperinmune en suero negativo de cerdo donante con lecturas de densidad óptica en el límite de detección a los 10 minutos de revelado.
- Control negativo (CN) → suero de cerdo donante negativo a la PPA.

6.2.1.2. ELISAs comerciales:

6.2.1.2.1. [®]Ingezim PPA COMPAC 11.PPA.K3, Ingenasa (Madrid, España): ELISA de bloqueo basado en la utilización de un anticuerpo monoclonal marcado frente a la proteína 72 del vPPA y empleado para detectar anticuerpos frente al vPPA en muestras de suero. En estos ensayos, si los sueros problema contienen anticuerpos específicos frente al vPPA impedirán la unión del monoclonal con el antígeno adsorbido a la placa (un extracto de la P72), de modo que la presencia de color indica la ausencia de anticuerpos en el suero problema mientras que la ausencia de color, indicará presencia de anticuerpos específicos.

El protocolo se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y una vez comprobada la validez del ensayo, se procedió a calcular los puntos de corte (CO) positivo y negativo, aplicando las fórmulas:

$$\Rightarrow \text{Punto de corte positivo (CO+)} = CN - [(CN - CP) \times 0,5]$$

$$\Rightarrow \text{Punto de corte negativo (CO-)} = CN - [(CN - CP) \times 0,4]$$

Todos los sueros con valores de absorbancia inferiores o iguales al CO+ se consideraron sueros positivos, los sueros con valores de absorbancia superiores o iguales al CO- se consideraron negativos, y aquellos cuyos valores de absorbancia comprendidos entre ambos puntos de corte se consideraron sueros dudosos.

6.2.1.2.2. ID Screen® African swine fever Indirect ELISA kit (IDvet, Grabels, Francia): ELISA indirecto basado en la utilización de las proteínas recombinantes p32, p62 y p72 del vPPA que permite analizar muestras de suero, plasma, jugo de carne.

El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y una vez comprobada la validez del ensayo las muestras fueron clasificadas como positiva, dudosa o negativa calculando el porcentaje de S/P mediante la fórmula:

$$\% \text{ S/P} = \frac{\text{DO muestra} - \text{DO CN}}{\text{DO CP} - \text{DO CN}} \times 100$$

Donde todas las muestras con % S/P inferiores o iguales al 30% se consideraron negativas, las muestras con % S/P superiores o iguales al 40% se consideraron positivas y aquellas con % de S/P entre ambos dudosas.

6.2.1.2.3. Svanovir® ASFV-Ab ELISA (Svanova, Uppsala Suecia): ELISA de tipo indirecto basado en la utilización de la proteína recombinante p30 del vPPA que permite analizar muestras de suero y plasma.

El procedimiento se realizó siguiendo las indicaciones del fabricante y una vez comprobada la validez del ensayo las muestras fueron clasificadas como positiva, dudosa o negativa calculando el porcentaje de positividad (PP) de cada una de las muestras mediante la siguiente fórmula:

$$\text{PP} = \frac{\text{DO muestra}}{\text{DO CP}} \times 100$$

Se consideran negativas todas las muestras con $\text{PP} \leq 10$, dudosas aquellas con $11 < \text{PP}_{\text{muestra}} < 19$ y positivas todas las muestras con valores de $\text{PP} \geq 20$.

6.2.2. Técnicas de confirmación: empleadas para la confirmación de muestras positivas y dudosas en las técnicas de cribado así como para el análisis de muestra en mal estado (p.ej. muy hemolizadas) o aquellas que se encuentran fuera del alcance de las técnicas de ELISA cómo los exudados de tejidos o el jugo de carne.

6.2.2.1. Inmunoblotting (IB) (Towbin y col., 1979; Neal Burnette 1981; Gershoni y Palade 1983; Jhonson y col., 1983; Escribano y col., 1989; Pastor y col., 1989; Alcaraz y col., 1990; Arias y col., 1993; Gallardo y col., 2013, Manual de la OIE, 2015, capítulo 2.8.1): Es la técnica recomendada por la OIE en el Manual de Pruebas Diagnósticas y Vacunas de los Animales Terrestres como técnica de confirmación de muestras positivas y dudosas

obtenidas mediante ELISA. Se basa en la detección de anticuerpos frente al vPPA utilizando tiras de nitrocelulosa a las que previamente se han transferido las proteínas del vPPA con pesos moleculares comprendidos entre los IP12.5 e IP35 KDa, separadas mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida. Las tiras de nitrocelulosa fueron preparadas conforme aparece descrito en el PNT de la página web del EURL: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_TIRAS_IB_1.pdf

El procedimiento se realizó siguiendo el protocolo incluido en el manual de la OIE y reflejado en la página web del EURL: [http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IB_1\(1\).pdf](http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IB_1(1).pdf)

Brevemente, tras un paso de bloqueo para evitar uniones inespecíficas, se añadieron los sueros problema permitiendo la formación de los inmunocomplejos antígeno-anticuerpo, que por la acción de la enzima peroxidasa en presencia del sustrato insoluble y del peróxido de hidrógeno producen un precipitado de color violeta, revelándose como bandas de dicho color en las tiras de IB.

Para leer los resultados cada una de las tiras se comparó con los controles positivo, límite y negativo incluidos en cada uno de los ensayos, de modo que un suero se consideró positivo si presentaba un patrón de reacción similar (aunque con mayor o menos intensidad) al del control positivo, mientras que si el suero no presentó bandas o éstas seguían un patrón inespecífico, el suero se consideró negativo. Los controles incluidos en el ensayo son los mismos utilizados en la técnica de ELISA-OIE (punto 6.2.1.).

6.2.2.2. Inmunoperoxidasa indirecta (IPT) (Pan y *col.*, 1982; Gallardo y *col.*, 2012a, 2013; 2015a): Ensayos realizados para la detección de anticuerpos frente al vPPA sobre placas de células infectadas con aislados adaptados a líneas celulares (puntos 2.2.1 y 2.2.2). Esta técnica nos permite detectar anticuerpos en un amplio abanico de muestras de origen porcino incluyendo suero, exudados de tejidos, plasma, sangre y jugo de carne.

6.2.2.2.1. Preparación de las placas (Pan y *col.*, 1982; Carrascosa y *col.*, 2011; de León y *col.*, 2013; Gallardo y *col.*, 2013, 2015a). Realizado conforme al PNT estandarizado en el INIA-CISA y disponible en la página web del EURL: http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PLACAS_IPT_1.pdf

Para la preparación de las placas se sembró un cultivo fresco de células MS o Vero en placas de 96 pocillos de fondo plano (Nunc) en medios EMEM o DMEM, respectivamente, enriquecido con un 10% de SFBi en ambos casos. Las placas se mantuvieron a $37\pm 3^{\circ}\text{C}$ en atmósfera de CO_2 hasta una confluencia del 90-100%,

momento en el cual se infectaron con una m.o.i. de 20 para el aislado BA71VR mientras que en el caso del aislado E70MS la m.o.i. osciló entre 0,2 y 0,5. Las células MS se incubaron 2h a 37°C y se añadió medio EMEM suplementado con un porcentaje de SFBi hasta una concentración final de 4%. La infección se mantuvo a 37±3°C durante 24h. En el caso de las células VERO la infección se mantuvo a 37±3°C en atmósfera de CO₂ durante 18h. Pasado el tiempo de infección (24 o 18h) las placas se fijaron añadiendo una solución de fijado (acetona-metanol) que se retiró a los 9-10 min. Las placas se lavaron durante 20 minutos con solución salina (PBS) en agitación continua antes de congelarlas a <-10°C. Una vez congeladas cada uno de los lotes de placas fue testado individualmente.

Para ello, y siguiendo el protocolo de la IPT (punto 6.2.2.2.2.), se incluyeron los controles positivo (CP) y negativo (CN) en diluciones seriadas en base 2 empezando en 1/20 hasta 1/2560, y los controles de verificación interna (CV) a la dilución de uso (1/40) (ver *controles de IPT*).

Cada lote se consideró válido siempre que:

- ⇒ El CP presentara el patrón de positividad en la dilución 1/1280.
- ⇒ El CN no presentara ninguna célula teñida en la dilución 1/20.
- ⇒ El CV₄ presentara patrón de positividad aunque fuera débil.
- ⇒ La confluencia del tapiz celular estuviera en torno al 90%.

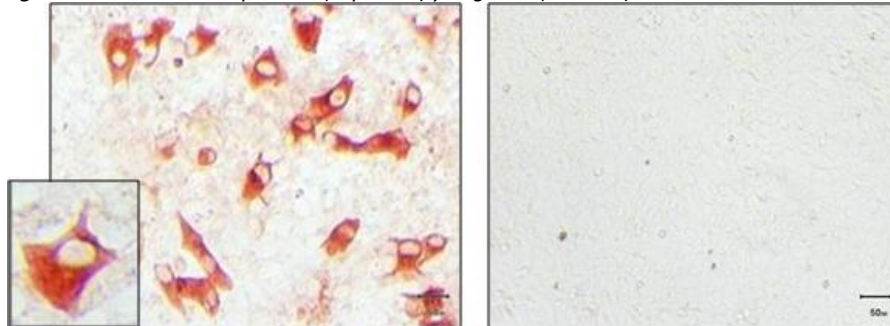
6.2.2.2.2. Realización de la técnica de IPT: Procedimiento realizado conforme aparece descrito en la página web del EURL, [http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IPT_1\(1\).pdf](http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IPT_1(1).pdf) .

Brevemente, las placas después de mantenerlas a temperatura ambiente durante 30 min, se bloquearon durante una hora en agitación con la solución de bloqueo. A su vez las muestras se preincubaron durante una hora en solución de bloqueo con un 2% de SFBi (Linus) a la dilución de uso (1/40). Transcurrido el tiempo de incubación se añadieron las muestras problema y los controles manteniéndose en agitación continua durante 45 minutos. Tras los lavados se añadió el conjugado (proteína A) marcado con peroxidasa y tras la incubación se repitió el paso de lavado. El revelado se realizó añadiendo una solución de AEC (3aminoetilcarbazol) y dimetilformamida en tampón acetato con peróxido de hidrógeno como sustrato.

Los resultados se leyeron al microscopio y para ello cada una de los pocillos se comparó con los controles incluidos en cada uno de los ensayos. Un suero se consideró positivo si presentaba un patrón de positividad similar al del control positivo o al de los controles de verificación (CV), es decir, las células infectadas presentaban el citoplasma teñido de un rojo más o menos intenso, mientras que las muestras en las

que el citoplasma permaneció blanco (al igual que en el control negativo) se consideraron negativas tal y como muestra la **figura 13**.

Figura 13 → Resultados positivo (izquierda) y negativo (derecha) en la técnica de la IPT



En ocasiones muestras obtenidas de animales vacunados presentaron un color rojizo inespecífico en todo el pocillo (no sólo en el citoplasma de las células). En esos casos las muestras se analizaron en paralelo sobre células infectadas y no infectadas.

⇒ Como **controles** se utilizaron:

- **Control positivo** → control límite de ELISA – OIE que se corresponde a una dilución 1/32 de suero hiperinmune en suero negativo de cerdo.
- **Controles de verificación internos** → (CV₁, CV₂, CV₃ y CV₄): diluciones 1/10; 1/20; 1/40 y 1/80 del control positivo de IPT en suero de cerdo donante.
- **Control negativo** → suero de cerdo donante negativo a la PPA.

6.3. **Análisis estadístico.**

Para el cálculo de la sensibilidad y la especificidad de cada una de las técnicas analizadas se eligieron la IPT y la UPL-PCR en tiempo real como técnicas de referencia estándar para la detección de anticuerpos o del vPPA respectivamente en base a estudios previos realizados (Gallardo y *col.*, 2012a, 2013, y Fernández-Pinero y *col.*, 2013). Todas las muestras con resultados “dudosos” se consideraron positivas. El nivel (grado) de concordancia entre cada una de las técnicas se calculó como la proporción total de coincidencias entre los resultados obtenidos por cada uno de los tests ensayados (a+d) frente al número total de ensayos realizados (N) mediante tablas de contingencia dos-por-dos (**tabla VIII**):

Tabla VIII → Tabla 2x2 empleada en el cálculo de concordancia.

TABLA DE CONTINGENCIA 2X2		Método 1		TOTAL
		Positivo	Negativo	
Método 2	Positivo	a	b	a+b
	Negativo	c	d	b+d
TOTAL		a+c	b+d	N

Con el fin de determinar qué porcentaje de dicha concordancia es debida al azar, se empleó el **Índice de Concordancia Kappa (κ)** expresado como la proporción de coincidencias observadas frente a las esperadas por azar (Cohen, 1960). Así, el grado de concordancia aparece determinado en función del valor de κ , tal y como se especifica en la **tabla IX** (Everit, 1989).

Tabla IX → Grado de concordancia entre dos técnicas en función del valor de Kappa.

Valor de Kappa	Grado de concordancia
0	Sin concordancia
0,01 - 0,20	Insignificante
0,21 - 0,40	Bajo
0,41 - 0,60	Moderado
0,61 - 0,80	Bueno
0,81 - 1,00	Prácticamente perfecto

7. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR.

7.1. Genotipado convencional (Bastos y col., 2003; Nix y col., 2006; Boshoff y col., 2007; Gallardo y col., 2009a; 2011a, b, c; 2014a, Manual de la OIE 2015, capítulo 2.8.1). El genotipado convencional de los aislados del PPA se basa en el análisis de tres regiones independientes del genoma del iru localizadas en la región central conservada y que comprenden; i) el extremo carboxi terminal de la proteína p72, codificada por el gen *B646L* que permite la clasificación de los aislados virales en los 22 genotipos hasta el momento descritos (Boshoff y col., 2007), ii) secuencia completa de la proteína p54 codificada por el gen *E183L* (Gallardo y col., 2009a), y iii) la secuenciación de la región central variable (RCV) dentro del gen *B602L* caracterizada por la presencia de secuencias repetidas en tándem (Nix y col., 2006; Gallardo y col., 2011b). En la **tabla X** se muestran los cebadores utilizados para amplificar cada una de las regiones incluidas en el genotipado convencional.

Tabla X → Descripción de los cebadores empleados en el genotipado convencional

CEBADORES	SECUENCIA 5'→3'	Fragmento que amplifican	Tamaño amplificón*	Referencia
P72-U	5'-GGCACAAGTTCGGACATGT'-3'	p72	478pb	Bastos y col., 2003
P72-D	5'-GTACTGTAAACGCAGCACAG-3'	(gen <i>B646L</i>)		
ASF89	5'-TGTAATTTTCATTGCGCCACAAC-3'	p54	676pb	Gallardo y col., 2009
ASF722	5'-CGAAGTGCATGTAATAAACGTC-3'	(gen <i>E183L</i>)		
CVR1	5'-ACTTTGAAACAGGAAACWAATGATG-3'	pB602L	665pb	Gallardo y col., 2011b
CVR2	5'-ATATTTTGTAAATATGTGGGCTGCTG-3'	(gen <i>B602L</i>)		

W= (AT) cebador degenerado.

*tamaño amplificado tomando como referencia el aislado español del VPPA Ba71V (GenBank Acc no. ASU18466)

En todos los casos la amplificación se realizó en termocicladores 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) siguiendo el PNT disponible en la página web del EURL, http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_GENOTIPADO.pdf

En cada uno de los ensayos de PCR además de incluir los controles positivo y negativo de extracción especificados en el punto 6.1.1.5, se incluyeron un control positivo y uno negativo de reacción, para garantizar el buen funcionamiento del proceso de amplificación y descartar la presencia de contaminantes.

⇒ Como **controles de PCR** se utilizaron:

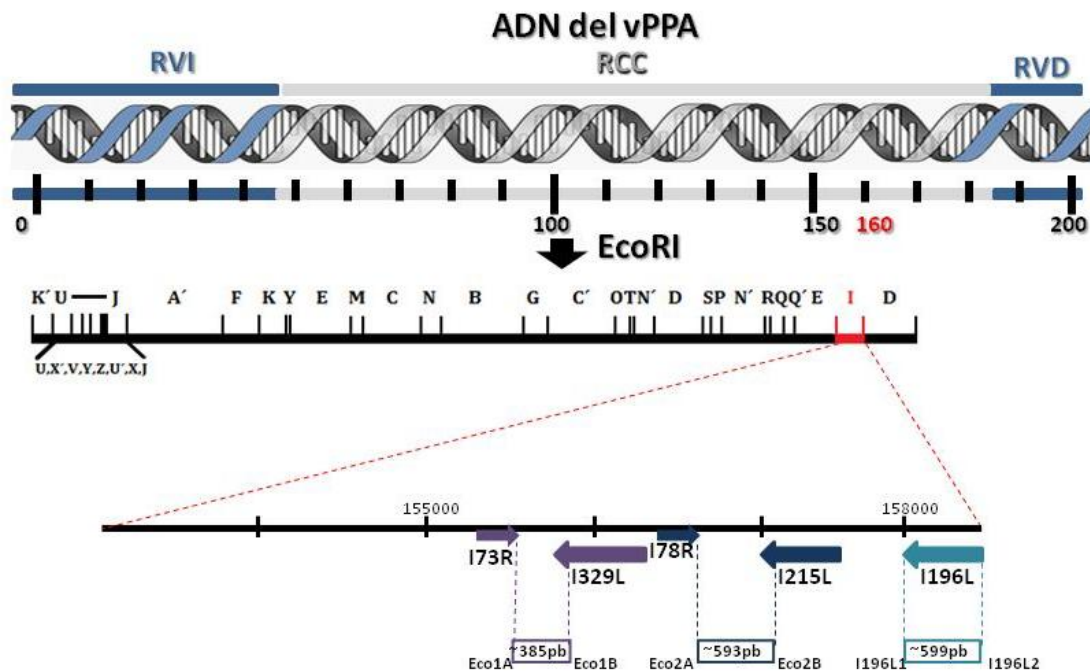
- Control positivo reacción genotipo I → ADN extraído del control positivo de reacción (E70, dilución 10^{-4}), positivo en la PCR convencional prescrita por la OIE y con valores de $28 \leq Ct \leq 3$ en la PCR en tiempo real prescrita por la OIE.
- Control positivo reacción genotipo II → ADN extraído del aislado Arm07 (Armenia 2007, genotipo II) crecido en cultivo primario de leucocitos y previamente clasificado como positivo.
- Control negativo → agua libre de ARNasas.

7.2. **Regiones alternativas.** (Gallardo y col., 2009a; 2011a,b,c; 2014a):

Además de los estándares internacionales existentes para el tipado y subtipado de aislados de vPPA y con el fin establecer diferencias genéticas entre aislados relacionados geográficamente, se analizaron varias regiones para ser utilizadas como marcadores genéticos alternativos que permitan establecer vínculos epidemiológicos y filogenéticos entre los diferentes aislados.

En concreto se analizaron 3 regiones de vPPA, ricas en secuencias repetidas en tándem (SRT) y situadas dentro del fragmento Eco RI-I, localizado próximo al extremo variable derecho del genoma (**figura 14**). Los tres fragmentos seleccionados comprenden dos regiones intergénicas situadas entre los genes *I73R-I329L* e *I78R-I215L* y la región codificante que corresponde con el gen *I196L* (Rodríguez y col., 1992; Dixon y col., 1990; 1994; Yañez y col., 1995, Gallardo, 2003; Malogolovkin y col., 2012; Gallardo y col., 2014a).

Figura 14 → Localización en el genoma del vPPA de las tres regiones variables analizadas dentro en la región EcoRI (Rodríguez y col., 1992)



Para favorecer la amplificación de los aislados circulantes en los países del este de Europa se diseñaron cebadores específicos a partir de la secuencia del genoma completo del aislado de Georgia 2007 disponible en GenBank (nº de acceso FR682468.1). Los cebadores se diseñaron utilizando el programa Primer3web version 4.0.0 <http://bioinfo.ut.ee/primer3/> (Koressaar y Remm 2007; Untergrasser y col., 2012).

Tabla XI → Cebadores empleados en la caracterización molecular utilizando regiones alternativas del genoma del vPPA

CEBADOR	SECUENCIA 5'→3'	Fragmento que amplifican	Tamaño amplificación*	Tª y tiempo de anillamiento
Eco1A	5'-CCATTTATCCCCRCTTTGG-3'	R.Intergénica I73R/I329L	356pb	60°C 30''
Eco1B	5'-TCGTCATCCTGAGACAGCAG-3'			
Eco 2A	5'-TCCTACCTGTTAAGCCACTTCC-3'	R.Intergénica I78R/I215L	605pb	60°C 1'
Eco 2B	5'-GCAAATGTGGATGCAGCTAA-3'			
I196L1	5'-ACAGGGAAAAAGGGGATTA-3'	pI196L	599pb	50°C 1'
I196L2	5'-AGTTAGCATTAGTTTACTTGTAA-3'	(gen I196L)		

R= (AG) cebador degenerado

*tamaño amplificado tomando como referencia el aislado de Georgia del VPPA Georgia 2007 (GenBank Acc no. FR682468.1).

En todos los casos la amplificación se realizó en termocicladores 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystem) añadiendo ADN extraído de las muestras a analizar (punto 6.1.1.1) y que se usó como molde en la reacción de PCR. La mezcla de reacción se preparó con las concentraciones finales descritas en la **tabla XII**.

Tabla XII→ Reactivos y concentraciones empleadas en las mezclas de reacción utilizadas en la caracterización molecular de regiones alternativas.

REACTIVOS DE LA MEZCLA DE REACCIÓN	CONCENTRACIÓN FINAL/REACCIÓN	
	Eco 1A-1B	Eco 2A-2B I196L1-L2
PCR Buffer 10X	1X	1X
Cl ₂ Mg 25 mM	2 Mm	2,5 mM
dNTPs 10 mM	0,2 mM	0,2 mM
Cebadores 20 µM	0,2 µM	0,4 µM
Taq Gold 5 U/µl	0,025 U/µl	0,025 U/µl
H ₂ O libre de ARNasas	c.s.p 23 ó 46µl	

Los ciclos de PCR empleados variaron sólo en la temperatura de anillamiento (T_m específica) en función de los cebadores seleccionados (ver **tabla XI**). El ciclo estándar utilizado en todos los casos fue de 40 ciclos consecutivos a una temperatura de desnaturalización de 95°C (30 segundos), T_m específica y temperatura de elongación de 72°C (1 minuto). Los productos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 2% mediante tinción con bromuro de etidio bajo la acción de la luz UV.

En cada uno de los ensayos de PCR además de incluir los controles positivo y negativo de extracción, se incluyeron un control positivo y uno negativo de reacción para garantizar el buen funcionamiento del proceso de amplificación y descartar la presencia de contaminantes. Para una mejor diferenciación de los productos amplificados en base a las diferencias de tamaño entre los distintos aislados, se incluyeron como controles de reacción, además de los descritos en el punto 7.1, el ADN extraído del aislado del genotipo II Ukr12/Zapo (Ucrania 2012)

7.3. Análisis de secuencias y construcción de árboles filogenéticos.

Para la caracterización molecular, los amplicones resultantes se enviaron a secuenciar utilizando los mismos cebadores de los ensayos de PCR (puntos 7.1 y 7.2.).

El ADN amplificado fue purificado con el kit ExoSAP - IT (GE Healthcare) y su secuencia se obtuvo bidireccionalmente en el servicio de secuenciación del INIA- CISA en un secuenciador ABI 3730 XL DNA Analyzer mediante un kit dideoxy, Big Dye Terminator (versión 3.1) Cycle Sequencing Kit.

Las secuencias obtenidas fueron editadas con el programa BioEdit (www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html) y alineadas con el programa Clustal Omega (<http://www.clustal.org/>). Posteriormente se calcularon las distancias genéticas con el modelo de cálculo de distancia observada (o distancia p) que se expresa como el número de diferencias nucleotídicas por posición, generándose así la matriz de distancias. Posteriormente, se efectuó un análisis de “bootstrap” de 1000 repeticiones y se construyó un árbol filogenético utilizando el método de mínima evolución (ME) usando el algoritmo CNI por sus siglas en inglés, Close-

Neighbor -Interchange (CNI) en un nivel de búsqueda de 1 utilizando el programa MegaV6.0 (Tamura y *col.*, 2013).

El análisis y alineamiento de las secuencias correspondientes a las regiones caracterizadas por la presencia de SRT, como la RCV, se realizó de forma manual para una mejor visualización de los resultados obtenidos.

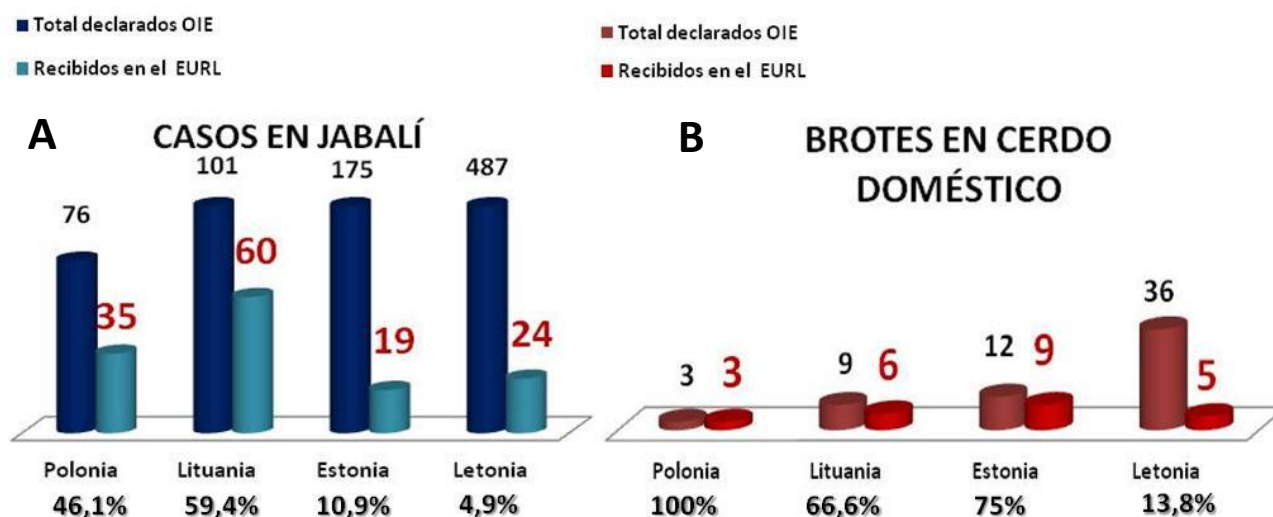
RESULTADOS

1. Diagnóstico de la PPA.

Desde el año 2012 hasta el 10 de agosto del 2015, se recibieron en el EURL un total de **663 muestras de campo** sobre las que se realizó el diagnóstico de la PPA utilizando tanto las técnicas de detección del virus como las de detección de anticuerpos según lo descrito en materiales y métodos. De las 663 muestras recibidas, 657 fueron procedentes de los brotes que han tenido lugar desde el año 2014 en cerdo doméstico y en jabalí en los cuatro países afectados de la UE -Lituania, Polonia, Letonia y Estonia-. Las 6 restantes se corresponden a muestras procedentes de los brotes que tuvieron lugar en cerdo doméstico en Ucrania ($n=3$) en el 2012 y en el 2015 y al brote declarado en Bielorrusia ($n=3$) en la región de Grodno a 40 Km de distancia de la frontera con Lituania en junio del 2013.

De las 657 muestras recibidas de la UE, 496 (75,5%) fueron de 284 jabalíes y 161 (24,5%) de 77 cerdos domésticos. Estas muestras representan el 16,4% del número total de casos en jabalí (839) y el 38,3% del número total de brotes en cerdo doméstico (60) ocurridos en la UE desde enero de 2014 hasta 10 agosto de 2015. En la **figura 15** está representado el número de casos/brotes recibidos por país en relación al número total de casos/brotes declarados a la OIE.

Figura 15 → Representación esquemática del número de casos en jabalíes (**A**) y brotes en cerdo doméstico (**B**) recibidos en el EURL de cada uno de los países de la UE en relación al número total de casos/brotes declarados a la OIE. En la parte inferior se muestra el porcentaje total por país.



Una vez recibidas y clasificadas las muestras se procesaron según lo descrito en el apartado 2.5.1. de materiales y métodos realizándose posteriormente el diagnóstico de la PPA.

1.1. Diagnóstico virológico.

El diagnóstico virológico se realizó inicialmente mediante las técnicas de PCR prescritas por la OIE (Agüero y col., 2003 y King y col., 2003), pero a raíz del desarrollo y optimización de la técnica de UPL-PCR en tiempo real (Fernández-Pinero y col., 2013), ésta se incluyó de forma rutinaria en el diagnóstico virológico de la enfermedad debido a su mayor sensibilidad (apartado 3 de resultados).

Utilizando las técnicas de PCR en tiempo real se analizaron un total de 631 muestras de las 663 recibidas (95,17%). De ellas 607 (96,19%) fueron positivas mediante la UPL-PCR, mientras que con la técnica prescrita por la OIE el porcentaje de positividad disminuyó a 91,6% (578/631). Hay que destacar que de las muestras positivas a PCR, 31 presentaron valores de Ct superiores a 35 con la técnica de UPL-PCR y fueron clasificadas como positivas débiles. De las 31, 27 fueron negativas cuando se analizaron con la OIE-PCR en tiempo real (**tabla XIII**). La técnica de PCR convencional de la OIE (Agüero y col., 2003) sólo se utilizó inicialmente para el análisis de 256 muestras, debido a que muestras con resultado moderadamente positivo (Ct > 30) en PCR en tiempo real daban resultado falso negativo cuando se analizaban con esta PCR, cómo se describe en el apartado 3 de resultados.

Tabla XIII → Resultados comparativos en la detección del genoma del vPPA mediante las técnicas de PCR en tiempo real.

en tiempo real.													
HOSPEDADOR/Nº MUESTRAS RECIBIDAS		PCR en tiempo real de la OIE						UPL-PCR en tiempo real					
		Muestras analizadas		Positivas		Negativas		Muestras analizadas		Positivas		Negativas	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%	Nº	%
Jabalí	496	483	97,3	430	89	53	10,9	483	97,3	459	95	24	4,9
Cerdo doméstico	167	148	88,6	148	100	0	0	148	88,6	148	100	0	0
TOTAL	663	631	95,1	578	91,6	53	8,3	631	95,1	607	96,2	24	3,8

Mediante la técnica de aislamiento viral en cultivos primarios de leucocitos porcinos y/o MAP se analizaron un total de 349 muestras, de las cuales 83 se correspondían con muestras procedentes de 57 cerdos domésticos y 266 de 216 jabalíes. Todas las muestras habían sido previamente clasificadas como positivas a PCR. Después de 3 pases en cultivos primarios se consiguió aislar el virus en 47 de los 57 cerdos domésticos analizados (82,4%). Sin embargo en el caso de los jabalíes sólo se consiguió aislamiento positivo en 67 de los 216 (31%), a pesar de los elevados valores de ADN viral encontrado en la mayoría de las muestras. Hay que destacar que todos los aislados obtenidos presentaron un patrón hemoabsorbente.

Finalmente, para cada uno de los animales analizados se emitió un **diagnostico virológico definitivo** considerando los resultados obtenidos mediante la técnica de UPL-PCR en tiempo real como técnica de referencia (**tabla XIV**). Todos los cerdos domésticos resultaron positivos. En el caso de los jabalíes, 260 de los 282 analizados (92,2%) dieron un resultado positivo y 24 (8,5%) fueron negativos en la detección del genoma del vPPA.

Tabla XIV → Diagnóstico virológico final (UPL-PCR) en el total de los animales recibidos

HOSPEDADOR/ Nº DE ANIMALES RECIBIDOS		DIAGNÓSTICO VIROLÓGICO					
		Animales analizados		Positivos		Negativos	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Jabalí	284	282	99,3	260	92,2	24	8,5
Cerdo doméstico	85	85	100	85	100	0	0
TOTAL	369	367	99,46	345	94,01	24	6,54

1.2. Diagnóstico serológico.

Para determinar la presencia de anticuerpos específicos frente al vPPA, 509 de las 663 muestras recibidas se analizaron mediante la técnica de la IPT. El tipo de muestras analizadas incluyó suero, sangre, exudados de tejidos, macerado de médula ósea y fluidos. La presencia de anticuerpos se confirmó en 263 muestras (51,7%), siendo la mayoría de ellas procedentes de jabalíes -56,2% frente al 39,6% de cerdo doméstico (**tabla XV**).

Tabla XV → Detección de anticuerpos específicos frente a vPPA mediante la técnica de la IPT.

HOSPEDADOR/ Nº MUESTRAS RECIBIDAS		Muestras analizadas		Positivas		Negativas	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Jabalí	496	370	74,5	208	56,2	162	43,8
Cerdo doméstico	167	139	83,2	55	39,6	84	60,4
TOTAL	663	509	76,7	263	51,7	246	48,3

Utilizando la técnica del ELISA indirecto de la OIE y el ELISA de bloqueo de INGENASA se analizaron 108 muestras de suero y fluidos. Todas las muestras fueron testadas en paralelo mediante la IPT mientras que sólo los positivos y dudosos se analizaron mediante la técnica de IB. De las 108 muestras analizadas, 48 (44,4%) resultaron positivas o dudosas en alguno de los dos ELISAs empleados. El resultado se confirmó por IPT en 45 de las 48 positivas, mientras que sólo 36 fueron claramente positivas mediante la técnica de IB. Tres muestras de suero (una de cerdo doméstico y dos de jabalí) no se confirmaron como positivos ni por IPT ni por IB. Comparando los resultados obtenidos en ELISA y en IPT en el total de muestras analizadas en paralelo, el porcentaje de muestras positivas fue del 44,4% mediante el ELISA frente al 63,9% obtenido con la IPT (**tabla XVI**).

Tabla XVI → Resultados comparativos mediante las técnicas de IPT, ELISA e IB en la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA en 108 muestras de campo. En paréntesis se indica el total de muestras analizadas en paralelo.

HOSPEDADOR	Positivas IPT		Positivas ELISAs		Positivas ELISA confirmadas IB	Positivas ELISA confirmadas IPT
	Nº	%	Nº	%	Nº	Nº
Jabalí	55 (66)	83,3	39 (66)	59,1	33	37
Cerdo doméstico	14 (42)	33,3	9 (42)	21,4	3	8
TOTAL	69 (108)	63,9	48 (108)	44,4	36	45

El **diagnostico serológico final** de cada uno de los animales analizados se dio tomando como referencia los resultados obtenidos con la IPT (**tabla XVII**). El 53,3% (145/272) de los jabalíes analizados mostraron respuesta específica de anticuerpos frente al virus mientras que en el caso de los cerdos domésticos el porcentaje fue del 42,3% (33/78). Los títulos de anticuerpos se determinaron mediante IPT realizando diluciones seriadas en base dos. El 44,1% de los 145 jabalíes positivos presentaron títulos superiores a 1:1280 (10^4), título que sólo alcanzó el 15,1% de los cerdos domésticos (porcentaje calculado considerando como 100% todos los cerdos domésticos positivos en serología).

Tabla XVII → Diagnóstico serológico final en el total de los animales recibidos.

Total animales recibidos		Diagnóstico serológico					
		Animales analizados		Positivos		Negativos	
		Nº	%	Nº	%	Nº	%
Jabalí	284	272	95,7	145	53,3	127	46,7
Cerdo doméstico	85	78	91,8	33	42,3	45	57,7
TOTAL	369	350	94,8	178	50,9	172	49,1

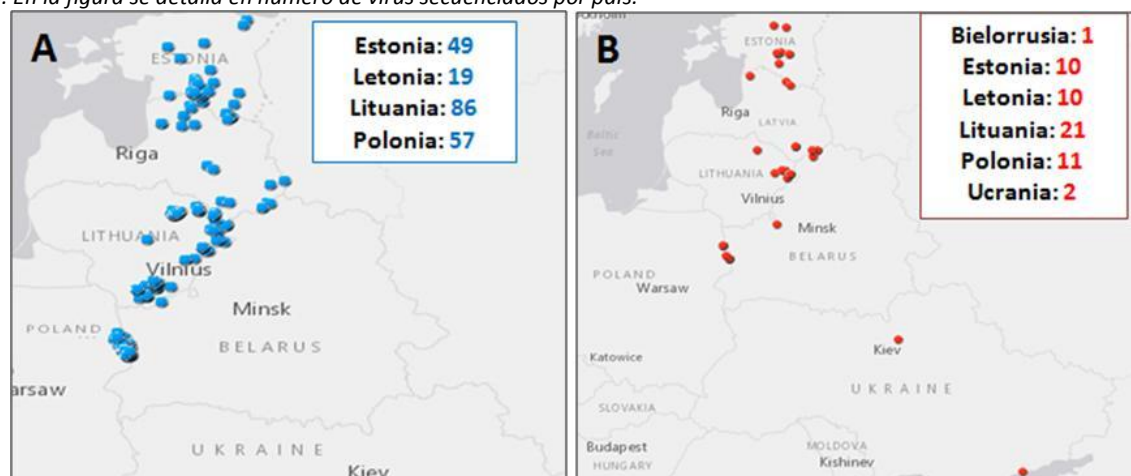
1.3. Diagnóstico final.

Para cada animal se proporcionó un **diagnóstico final** combinando los resultados obtenidos en las pruebas virológicas y en las serológicas y tomando como referencia las técnicas de UPL-PCR y de IPT, respectivamente. De todos los animales recibidos tan sólo 6 jabalíes fueron negativos a PPA confirmándose así la infección en el 98,5% (278) de los animales analizados, bien mediante el diagnóstico virológico o bien mediante el serológico. Un resultado interesante que merece la pena destacar es que en el 27% (39 de 145) de los jabalíes seropositivos se obtuvo un resultado positivo débil o negativo en PCR.

1.4. Caracterización molecular.

Con el fin de determinar el origen de los brotes y la dinámica de la enfermedad en los países afectados, se seleccionaron muestras positivas a PCR procedentes de animales representativos de cada uno de los brotes/casos recibidos. En total se secuenciaron 268 muestras procedentes de 57 cerdos domésticos y 211 jabalíes en los que se confirmó la presencia del vPPA (**figura 16**).

Figura 16 → Localización de los virus secuenciados procedentes de casos de jabalí europeo (A) y brotes de cerdo doméstico (B) seleccionados de las muestras recibidas en el EURL de los brotes/casos en el este de Europa desde el 2012 hasta agosto del 2015. En la figura se detalla en número de virus secuenciados por país.



La caracterización molecular se realizó mediante; i) las técnicas de genotipado convencional, y ii) el análisis de regiones alternativas (nuevos marcadores genéticos) según lo descrito en materiales y métodos (punto 7). Las secuencias obtenidas se compararon con secuencias previas disponibles en el EURL de aislados circulantes desde el año 2007 en el este de Europa pertenecientes al genotipo II (**tabla XVIII**).

Tabla XVIII → Aislados del vPPA del este de Europa del genotipo II desde el 2007 hasta el 2012 disponibles en la base de datos del EURL y utilizados en los estudios de caracterización molecular.

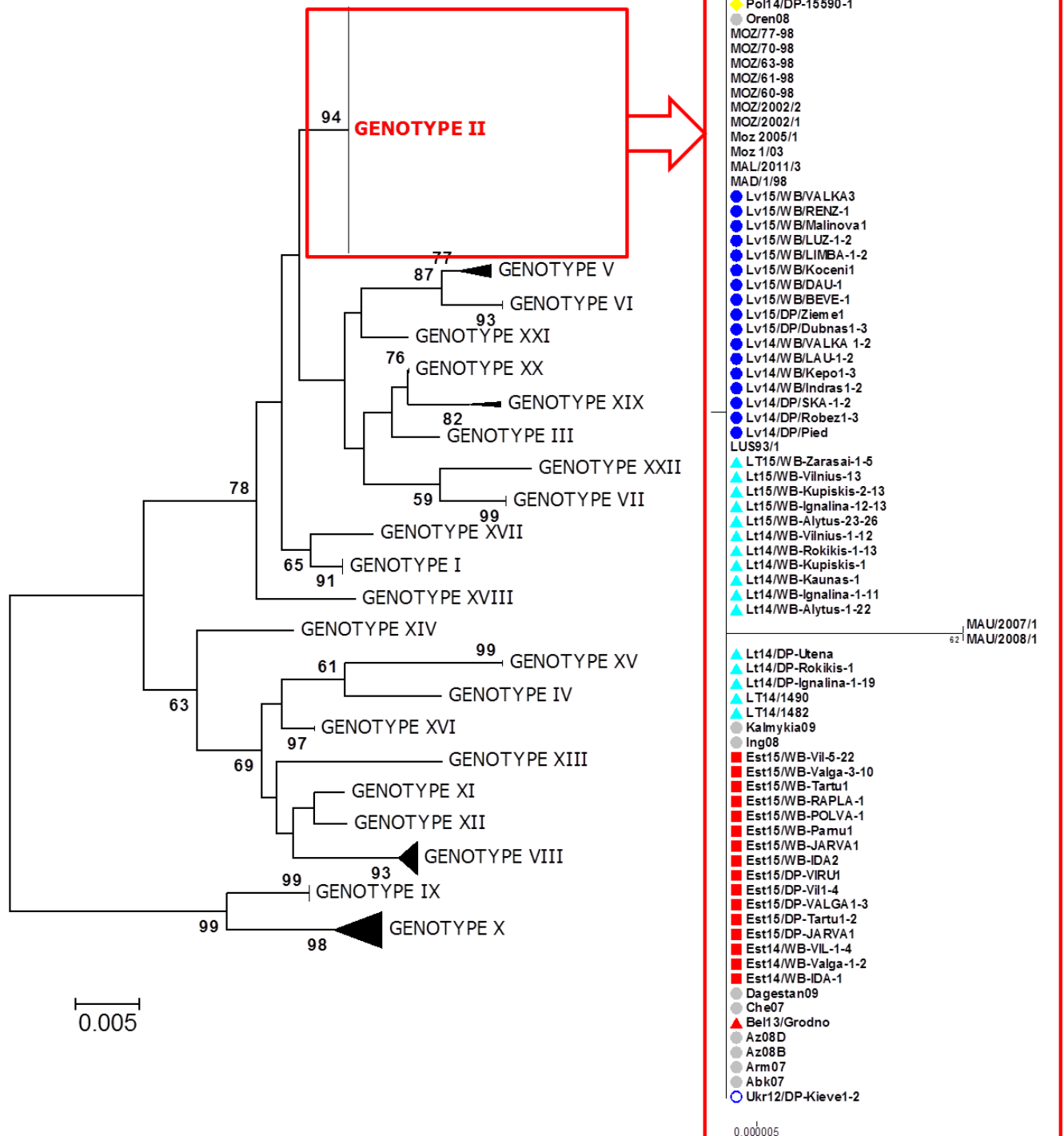
Aislado del VPPA	País	Localización	Hospedador	Fecha del brote	p72 gen GB Ac. N°	P54 gen GB Ac. N	CVR GB Ac. N°
Abk07	Georgia	Abkhazia Republic Gulripish	Cerdo doméstico	04/07/2007	JX857509	JX857495	JX857523
Arm07	Armenia	Dilijan town	Cerdo doméstico	07/08/2007	JX857508	JX857494	JX857522
Che07	Rusia	Chechnya Republic Shatoysky	Jabalí europeo	04/12/2007	JX857510	JX857496	JX857524
Az08D	Azerbaiyán	Qebele district	Cerdo doméstico	22/01/2008	JX857515	JX857501	JX857529
Az08B	Azerbaiyán		Cerdo doméstico	22/01/2008	JX857516	JX857502	JX857530
Ing08	Rusia	Ingushetia Republic Sunzhensky	Jabalí europeo	21/07/2008	JX857511	JX857497	JX857525
Oren08	Rusia	Orenburg Chernorechye	Cerdo doméstico	10/07/2008	JX857512	JX857498	JX857526
NO08/Av	Rusia	Republic North Osetia Vladikavkaz	Cerdo doméstico	18/07/2008	JX857513	JX857499	JX857527
NO08/Ap	Rusia	Republic North Osetia Prigorodni	Cerdo doméstico	21/07/2008	JX857514	JX857500	JX857528
Dagestan09	Rusia	Tarumovsky, Respublika Dagestan	Jabalí europeo	11/09/2009	JX857517	JX857503	JX857531
StPet09	Rusia	Kirovsky, Leningradskaya Oblast	Cerdo doméstico	01/10/2009	JX857520	JX857506	JX857534
Kalmykia09	Rusia	Yashaltinsky, Kalmykiya-Khal'mg Tangch	Cerdo doméstico	10/10/2009	JX857519	JX857505	JX857533
Rostov09	Rusia	Krasnosulinsky, Rostovskaya Oblast	Cerdo doméstico	20/10/2009	JX857518	JX857504	JX857532
Tver0511/Torjo	Rusia	Torjo, Tver region	Cerdo doméstico	31/05/2011	KJ627208	KJ627186	KJ627197
Tver0312/Novo	Rusia	Novozavidovskii, Tver region	Cerdo doméstico	14/03/2012	KJ627212	KJ627190	KJ627201
Tver0312/Torjo	Rusia	Torjo, Tver region	Jabalí europeo	28/03/2012	KJ627211	KJ627189	KJ627200
Tver0712/Les	Rusia	Lesnoi, Tver region	Cerdo doméstico	16/07/2012	KJ627210	KJ627188	KJ627199
Tver0812/Bolo	Rusia	Bologovskii, Tver region	Jabalí europeo	15/08/2012	KJ627209	KJ627187	KJ627198
Tver1112/Zavi	Rusia	Zavidovo, Tver region	Jabalí europeo	20/11/2012	KJ627214	KJ627191	KJ627202

1.4.1. Resultados obtenidos mediante las técnicas de genotipado convencional.

Con el objetivo de clasificar los aislados virales seleccionados en uno de los 22 genotipos hasta el momento descritos (Boshoff *col.*, 2007), 478 pb del extremo carboxi terminal de la proteína p72 fueron amplificados utilizando los cebadores específicos p72U/D (Bastos y *col.*, 2003). Los productos de PCR fueron secuenciados y las secuencias obtenidas se compararon con secuencias disponibles en el GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) representativas de cada uno de los 22 genotipos descritos, dando lugar a un conjunto final de 403 secuencias. El árbol filogenético generado con el método de ME permitió clasificar a todos los virus de la PPA secuenciados dentro del **genotipo II de la p72**. Todos ellos presentaron un 100% de homología con los aislados del VPPA circulantes en el este de Europa desde el año 2007, incluido el primer aislado que se obtuvo en Georgia en el 2007 (GenBank Acc n°. AM999764.1). Dentro del clúster del genotipo II se englobaron también los aislados procedentes del este de África obtenidos en Tanzania (TAN/12/Ifakara, TAN/11/Temeke, TAN/11/Ludewa, TAN/11/Chunya, TAN/10/Tukuyu, TAN/10/Kyela), Islas Mauricio (MAU/2008/1, MAU/2007/1) Mozambique (Moz 2005/1, Moz 1/03, MOZ/2002/1, Moz2002/2, Moz77/98, Moz70/98, Moz63/98, Moz61/98, Moz60/98), Madagascar (Mad/1/98), Zambia (Lus93/1) y Malawi (MAL/2011/3) (**figura 17**).

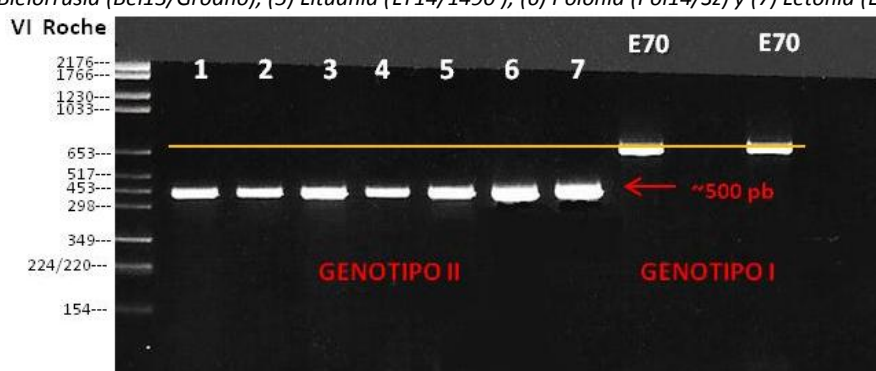
Una vez clasificados los virus dentro del genotipo II de la p72, y con el objetivo de establecer diferencias entre ellos, se procedió al estudio de la secuencia completa del gen *E183L* que codifica para la proteína p54. Para ello se utilizaron los cebadores específicos PPA89/722 (Gallardo y *col.*, 2009). Todos los virus secuenciados presentaron un 100% de homología entre ellos y con el aislado de Georgia 2007 (acceso de GenBank n° AM999765.1) tanto en la secuencia en nucleótidos como en aminoácidos, no pudiendo diferenciar entre los vPPA circulantes. Debido a ello, el análisis de esta región se utilizó sólo en los estudios iniciales realizados desde el 2012 hasta mayo del 2014. Esto incluyó a los aislados recibidos de Bielorrusia, Ucrania y de los primeros brotes ocurridos en la UE, tanto en Lituania como en Polonia.

Figura 17 → Árbol filogenético construido con el método de ME basado en las distancias genéticas de las secuencias en nucleótidos del extremo carboxi-terminal de la proteína p72 del vPPA. Los números en los nodos corresponden a la que frecuencia con la que aparecen los grupos en el análisis de “bootstrap” de 1000 repeticiones (sólo se muestran ≥ 50). De forma resumida se han agrupado los virus secuenciados de Lituania (▲), Polonia (◆), Estonia (■), Letonia (●), Ucrania (○) y Bielorrusia (▲) por hospedador (WB =jabalí europeo; DP =cerdo doméstico), año y localización. En ● se muestran los aislados incluidos dentro del estudio circulando en el este de Europa desde el 2007.



Finalmente, y dentro del genotipado convencional, se amplificó la RCV incluida dentro del gen *B602L* con los cebadores específicos CVR1/2 (Gallardo *col.*, 2011b). El análisis de esta región permite establecer diferencias apreciables en geles de agarosa al 2% en función del tamaño de los productos amplificados. Como se puede observar en la **figura 18**, el tamaño del amplicón en los virus inicialmente caracterizados de Ucrania (2012), Bielorrusia (2013), Lituania (2014), Polonia (2014) y Letonia (2014), fue de alrededor 500 bp, tamaño idéntico al de los aislados del genotipo II de Armenia 2007 y Azerbaiyán 2008 disponibles en el EURL. El aislado del vPPA E70 perteneciente al genotipo I e incluido como control de la reacción de PCR, presentó un amplicón con un tamaño de alrededor 650pb. Por lo tanto, y para una rápida visualización del genotipo circulante, en los análisis posteriores de caracterización molecular se incluyeron de forma rutinaria como controles de PCR tanto el aislado E70 representativo del genotipo I, como los aislados del genotipo II de Armenia (Arm07) y Ucrania (Ukr12/Zapo).

Figura 18 → Diferencias en el tamaño de los amplicones obtenidos mediante la amplificación de la RCV en un gel de agarosa al 2%. Se muestran aislados representativos del genotipo II de (1) Armenia (Arm07), (2) Azerbaiyán (Az08), (3) Ucrania (Ukr12/Zapo), (4) Bielorrusia (Bel13/Grodno), (5) Lituania (LT14/1490), (6) Polonia (Pol14/Sz) y (7) Letonia (Lv14/DP/Robez1).



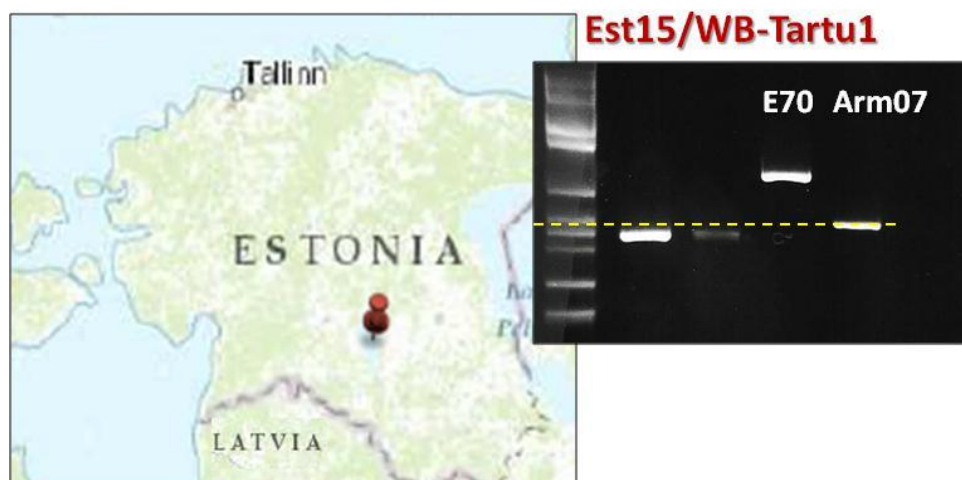
El análisis de la secuencia aminoacídica de los aislados del genotipo II mostró la presencia de diez copias de tetrámeros del tipo BNDBNDBNAa (Rowlands *y col.*, 2008) idéntica a la secuencia del aislado de Georgia 2007 (acceso de GenBank nº AM999767.1) y a la de todos los virus secuenciados desde el año 2007 del este de Europa descritos en la **tabla XIX**. El tipo de SRT identificada es característica también de los aislados africanos obtenidos de las islas de Madagascar y Mozambique (datos no mostrados).

Tabla XIX→ Secuencia en aminoácidos de las repeticiones tetraméricas dentro de la región central variable (RCV) del gen B602L identificadas en los virus pertenecientes al genotipo II de la p72 del este de Europa. Clave: B (CADT); N (NVDI); D (CASM); A (CAST); a (CTST).

Aislado del VPPA	País	Nº SRT	TIPO DE REPETICIONES	SECUENCIA EN AMINOÁCIDOS
Abk07	Georgia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Arm07	Armenia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Che07	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Az08D	Azerbaiyán	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Az08B	Azerbaiyán	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Ing08	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Oren08	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
NO08/Av	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
NO08/Ap	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Dagestan09	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
StPet09	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Kalmykia09	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Rostov09	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver0511/Torjo	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver0312/Novo	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver0312/Torjo	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver0712/Les	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver0812/Bolo	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Tver1112/Zavi	Rusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Ukr12/Zapo	Ucrania	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Bel13/Grodno	Biellorrusia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Lt/1490	Lituania	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Pol14/Sz	Polonia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI
Lv14/DP/Robez1	Letonia	10	BNDBNDBNAa	LHAQSAYT CADT NVDI CASM CADT NVDI CASM CADT NVDI CAST CTST EYDLDTPERI

Todos los virus posteriormente secuenciados de la UE y de Ucrania 2015 presentaron el mismo patrón de SRT, con la excepción del virus de Estonia denominado Est15/WB-Tartu1 procedente de un caso de jabalí que tuvo lugar en la región de Tartu, municipio de Rannu, el 17 de julio del 2015. El fragmento amplificado por los cebadores CVR1/2 mostró un amplicón de un tamaño de alrededor 400 pb frente a los 500 pb característicos de los aislados del genotipo II (figura 19).

Figura 19→ Mapa con la localización del aislado Est15/WB-Tartu1, y gel de agarosa al 2% en el que se muestra la diferencia de tamaño con el aislado del genotipo II de Armenia (Arm07). Fuente: ArcGIS 10.2 y datos OIE. Creación propia.



El análisis de la secuencia aminoácídica reveló que la diferencia de tamaño observada en este virus se debía a la delección de 3 SRT (**CASMCADTNVDT**) dando lugar por lo tanto a 7 copias de tetrámeros del tipo BNDBNAa, en lugar de 10 como en el resto de aislados del genotipo II, tal y como se muestra en la **figura 20**.

Figura 20 → Alineamiento de los aminoácidos de la RCV del aislado Est15/WB-Tartu1 comparado con la secuencia del resto de aislados del genotipo II que circulan en este de Europa desde 2007. En colores aparecen representados las secuencias tetraméricas repetidas. Clave: **B** (CADT); **N** (NVDT); **D** (CASM); **A** (CAST); **a** (CTST).

Aislados del genotipo II	LHAQSAYT	CADTNVDT	CASMCADTNVDT	CASMCADTNVDT	CASMCADTNVDT	CASTCTST	EYTDLTDPERI
Est15/WB-Tartu1	LHAQSAYT	CADTNVDT	CASMCADTNVDT	-----	-----	CASTCTST	EYTDLTDPERI

1.4.2. Resultados obtenidos mediante el análisis de regiones alternativas del genoma del vPPA.

Con el objetivo de establecer diferencias genéticas entre los aislados circulantes en el este de Europa desde el 2007, se amplificaron 3 regiones alternativas caracterizadas por la presencia de SRT localizadas en la denominada región Eco-RI del genoma del vPPA (Rodríguez y col. 1992). Las regiones amplificadas incluyeron dos regiones intergénicas (entre los genes *I73R-I329L* e *I78R-I215L*) y la región codificante del gen *I196L*.

Se analizaron en paralelo un total de 165 virus procedentes de los brotes/casos ocurridos en Ucrania, Bielorrusia y los países de la UE desde el 2012 hasta enero del 2015. Asimismo en el estudio de caracterización mediante en el análisis de regiones alternativas, se incluyeron los 19 aislados del genotipo II descritos en la **tabla XVIII**. El análisis de las secuencias obtenidas tras la amplificación de la región intergénica *I78R/I215L* y el gen *I196L* reveló un 100% de homología entre todos los aislados secuenciados y con los aislados circulantes en el este de Europa desde el 2007, incluido el aislado de Georgia 2007 (acceso de GenBank nº FR682468.1).

Sin embargo, mediante la amplificación con los cebadores Eco1a/Eco1b de la región intergénica situada entre los genes *I73R* e *I329L*, se pudieron establecer diferencias entre los aislados circulantes en el este de Europa desde el 2007. La amplificación de los virus responsables de los primeros casos que tuvieron lugar en la UE (Lituania y Polonia), así como la de los virus obtenidos en Bielorrusia (2013) y Ucrania (2012), dio lugar a amplicones de alrededor 367 pb. El tamaño estimado en los aislados de Georgia, Armenia, Azerbaiyán y Rusia fue de 356 pb (datos no mostrados). El análisis de las secuencias en nucleótidos de los productos de la PCR reveló que la diferencia de tamaño se debía a la inserción de un SRT de 10 nucleótidos (**GGAATATATA**) en la posición nucleotídica 136. Dicha inserción estaba ausente en los aislados de Georgia, Armenia, Azerbaiyán y Rusia. Todos los virus posteriormente secuenciados de los cuatro países de la UE afectados así como el virus obtenido del brote de Ucrania del 2015 presentaron idéntica inserción de la SRT (**figura 21**).

Figura 21 → Alineamiento parcial de las secuencias de la región intergénica 173R-1329L de los aislados pertenecientes al genotipo II, incluido el aislado de Georgia del 2007. De forma resumida se han agrupado los aislados de Lituania, Polonia, Estonia, Letonia y Ucrania por hospedador y año.

	61	136	180
>Georgia2007	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Abk07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Arm07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Che07	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Az08D	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Az08B	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Ing08	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Oren08	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>NO08/Av	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>NO08/Ap	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Dagestan09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>StPet09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Kalmykia09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Rostov09	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Tver0511/Torjo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Tver0312/Torjo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Tver0312/Novo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Tver0712/Les	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Tver0812/Bolo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Bel13/Grodno	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Ukr12/Zapo	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Ukr15/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lv14/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lv14/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lv15/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Pol14/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Pol14/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Pol15/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Pol15/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lt14/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lt14/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Lt15/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Est14/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Est15/WB	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT
>Est15/DP	TAGTTTAAGCAGTAAATGTAGAATAACACAGTTAAGCAATAAATAACAAGTATATAGGAATATATAGGAATATATA	-----	GAAATATATAGAAATAGCTAAGCTTAATACTAAT

1.4.3. Resultados globales en los estudios de caracterización molecular de los aislados circulantes.

Combinando las técnicas de genotipado convencional con el análisis de las regiones alternativas, en concreto de la región intergénica (RIG) entre los genes *178R* e *1329L*, se procedió a la clasificación genética de los virus secuenciados, todos ellos pertenecientes al **genotipo II de la p72**. En resumen, el análisis de la RCV ha permitido la identificación de dos variantes genéticas presentes en los países de la UE, en concreto en Estonia. La variante denominada GII-CVR2 está asociada al virus responsable del caso que tuvo lugar en jabalí en la región de Tartu en julio del 2015. El resto de los virus secuenciados se engloban dentro de la variante GII-CVR1 que presenta un 100% de homología con el aislado de Georgia del 2007. La amplificación y posterior secuenciación de la RIG *178R-1329L* también nos ha permitido clasificar a los virus en dos variantes genéticas diferentes; i) la variante GII-RIG1 donde se clasifican los virus secuenciados desde el 2007 hasta el 2012 con un 100% de homología con el aislado de Georgia 2007, y i) la variante GII-RIG2 caracterizada por la inserción de una SRT que agrupa a todos los virus de la UE y a los virus secuenciados de Ucrania y Bielorrusia (**tabla XX**).

Tabla XX → Clasificación molecular de los aislados del este de Europa de cerdo doméstico (CD) y jabalí europeo (JE) secuenciados desde el año 2007 hasta agosto del 2015. De forma resumida se han agrupado los aislados de Lituania, Polonia, Estonia, Letonia y Ucrania por hospedador y año, a excepción del aislado estonio Est15/WB-Tartu1

Aislado del VPPA	País	AÑO	HOSPEDADOR	GENOTIPO P72	SUBTIPADO RCV		SUBTIPADO RIG ^{178R-1329L}
					Nº SRT	VARIANTE	VARIANTE
Abk07	Georgia	2007	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Arm07	Armenia	2007	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Che07	Rusia	2007	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Az08D	Azerbaiyán	2008	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Az08B	Azerbaiyán	2008	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Ing08	Rusia	2008	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Oren08	Rusia	2008	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
NO08/Av	Rusia	2008	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
NO08/Ap	Rusia	2008	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Dagestan09	Rusia	2009	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
StPet09	Rusia	2009	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Kalmykia09	Rusia	2009	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Rostov09	Rusia	2009	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver0511/Torjo	Rusia	2011	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver0312/Novo	Rusia	2012	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver0312/Torjo	Rusia	2012	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver0712/Les	Rusia	2012	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver0812/Bolo	Rusia	2012	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Tver1112/Zavi	Rusia	2012	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Ukr12/Zapo	Ucrania	2012	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Bel13/Grodno	Bielorrusia	2013	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB	Lituania	2014	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP	Lituania	2014	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB	Polonia	2014	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP	Polonia	2014	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB	Estonia	2014	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB	Letonia	2014	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP	Letonia	2014	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB	Estonia	2014	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB	Lituania	2015	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB	Polonia	2015	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP	Polonia	2015	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB	Estonia	2015	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Tartu1	Estonia	2015	JE	II	7	GII-RCV2	GII-RIG2
Est15/DP	Estonia	2015	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB	Letonia	2015	JE	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/DP	Letonia	2015	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Ukr15/DP	Ucrania	2015	CD	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

En el **anexo I** figura desglosada esta tabla, con todos los aislados secuenciados en el EURL entre 2012 y 2015 con el nombre completo del aislado, país y localidad de origen, hospedador del que proviene, genotipo, y subtipado.

2. Caracterización biológica de aislados circulantes del virus de la PPA.

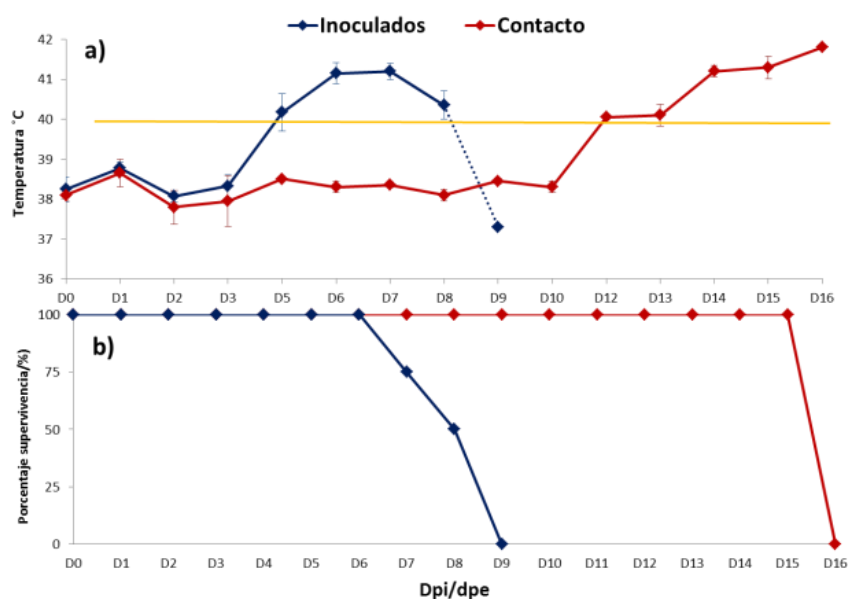
Con el fin de estudiar distintos aspectos biológicos de los aislados del vPPA circulando en el este de Europa tales como virulencia, aspectos clínicos y patológicos de la infección, respuesta inmunológica desencadenada en el hospedador y parámetros de transmisión, se han realizado tres infecciones experimentales en el EURL con tres aislados del vPPA del genotipo II obtenidos según lo descrito en materiales y métodos, apartado 2.1.

2.1. Infección experimental con el aislado Arm07 (Armenia).

Esta infección fue realizada con un total de 6 animales distribuidos en 1 box. Cuatro de ellos fueron inoculados por vía intramuscular con 10 UHAD₅₀ del aislado Arm07 (A1→ A4) y los dos restantes se mantuvieron como cerdos contacto en el mismo box (CA5 y CA6).

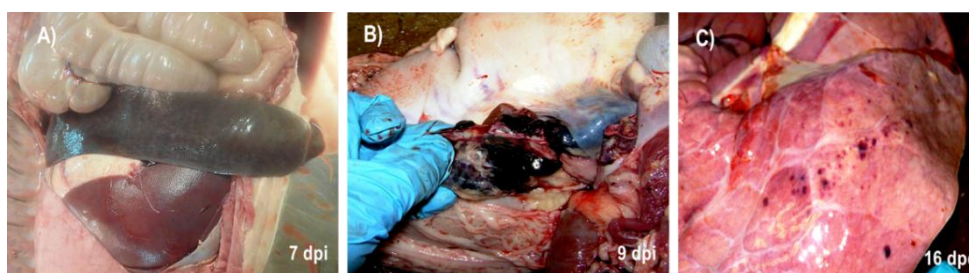
2.1.1. Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia: a los 4-5 días post inoculación (dpi), los animales inoculados empezaron a desarrollar una sintomatología clínica compatible con PPA aguda, que en los cerdos contacto se retrasó hasta el día 12 post contacto (dpc). Los síntomas clínicos estuvieron caracterizados principalmente por, fiebre (40-42°C) (**figura 22a**), anorexia, letargo, debilidad, decúbito y eritema. Los cerdos inoculados desarrollaron manchas cianóticas en la piel de las orejas, la cola, las patas o el muslo, mientras que en los contactos fue más evidente en la piel de las orejas. Dos de los 6 animales presentaron diarrea mucoide, que en uno de ellos fue sanguinolenta. Todos los animales murieron o fueron sacrificados por motivos humanitarios entre los 7 y 9 dpi y los 15 y 16 dpc, es decir, 3 y 4 días después de la aparición de los síntomas clínicos (**figura 22b**).

Figura 22→ (a) Temperatura media y **(b)** tasa de supervivencia de los animales inoculados y los contactos. La línea amarilla marca la fiebre, considerada a partir de 40°C. El proceso de hipotermia sufrido por uno de los animales inoculados el día del sacrificio está indicado como (--).



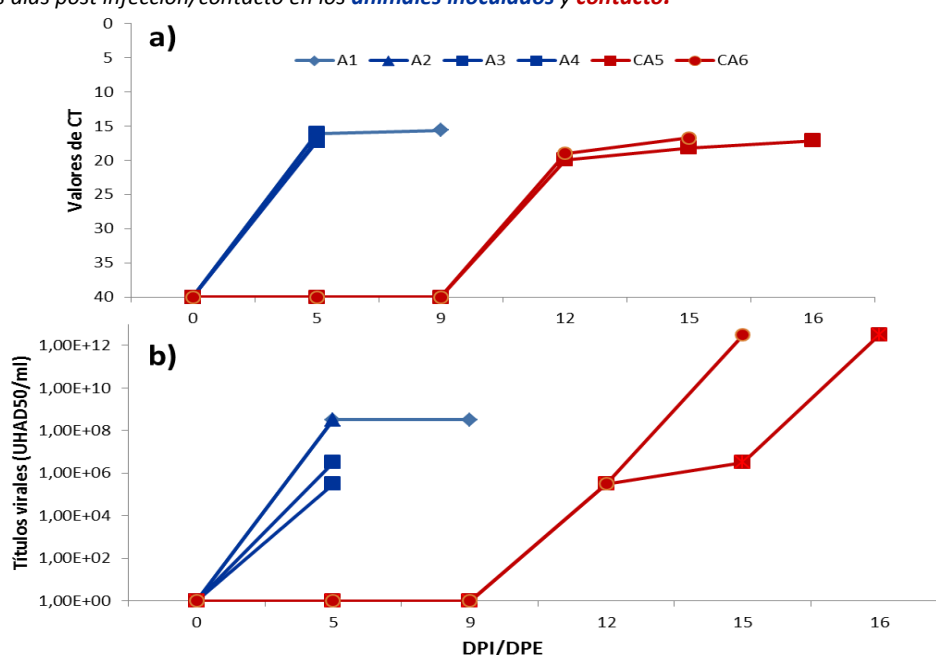
2.1.2. Examen *post-mortem* (lesiones macroscópicas): las lesiones macroscópicas estuvieron relacionados con un curso clínico agudo, tanto en los animales inoculados como en los contacto, y en general estuvieron caracterizadas por la presencia de; líquido ascítico en la cavidad abdominal (6/6), esplenomegalia hiperémica (5/6) (**figura 23a**), hidrotórax (4/6), hidropericardio, (3/6), linfadenitis hemorrágica, principalmente de los ganglios renal y gastro-hepático (6/6) (**figura 23b**), petequias en riñón (2/6) y pulmón (2/6) (**figura 23c**) y tonsilas congestivas (2/6).

Figura 23 → Detalle de lesiones macroscópicas **a)** esplenomegalia hiperémica en el día 7pi, **b)** linfadenitis hemorrágica del ganglio gastro-hepático 9dpi y **c)** petequias en pulmón 16 dpc.



2.1.3. Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral: la viremia se detectó mediante las técnicas de PCR en tiempo real y convencional de la OIE el día 5 pi (primer día de toma de muestras) en los animales inoculados, y el día 12 en los contactos (**figura 24a**). Los títulos máximos de virus en sangre (10^{12} UHAD₅₀/ml), determinados mediante la técnica de aislamiento viral en cultivos primarios, se detectaron en los animales contacto a los 15 y 16 días (**figura 24b**).

Figura 24→ **(a)** Viremia determinada mediante la PCR en tiempo real de la OIE y **(b)** título viral expresado en UHAD₅₀/ml a los diferentes días post infección/contacto en los **animales inoculados** y **contacto**.



Asimismo, se encontraron resultados positivos a PCR en todos los órganos recogidos, tanto en los animales inoculados como en los contacto.

En relación a la respuesta humoral, mediante la técnica de ELISA de INGENASA se detectaron anticuerpos específicos frente al vPPA en suero el día 16 pc en uno de los animales contacto. El resultado fue confirmado mediante la IPT y el IB.

2.1.4. Resumen de la experiencia con el aislado Arm07.

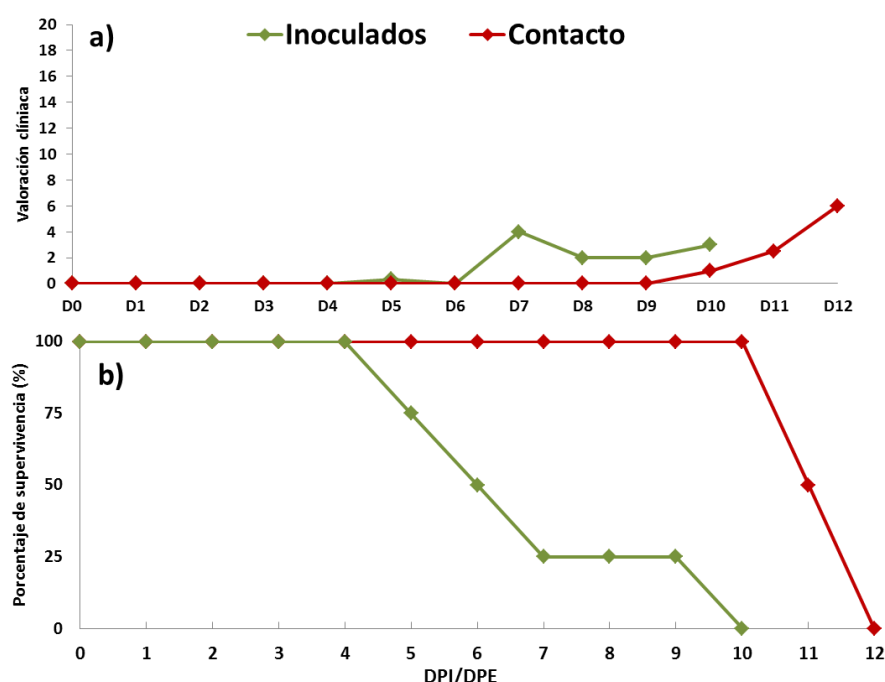
- Todos los animales, tanto los inoculados como los contactos, desarrollaron signos clínicos y lesiones compatibles con una **forma aguda de la enfermedad asociada a aislados virulentos del vPPA**, con una tasa de mortalidad del **100%**.
- La **muerte** de los animales inoculados tuvo lugar entre los **7 y 9 dpi** mientras que en los **animales contacto** tuvo lugar a los **15,16 dpc**. En los dos casos los animales murieron o fueron sacrificados 3-4 días después de la aparición de los primeros síntomas clínicos.
- La viremia se detectó por las técnicas prescritas por la OIE a día 5 pi (primer día de toma de muestras) en los animales inoculados, y a día 12 en los contacto, presentando **títulos virales superiores a 10^6 UHAD₅₀/ml**.
- Se detectó una **respuesta inicial de anticuerpos en uno de los animales contacto** en el día 16 post contacto.

2.2. Infección experimental con el aislado Ukr12/Zapo (Ucrania).

Esta infección fue realizada con un total de 6 animales distribuidos en 1 box. Cuatro de ellos fueron inoculados por vía intramuscular con 10 UHAD₅₀ del aislado Ukr12/Zapo (U1→ U4) y los dos restantes se mantuvieron como cerdos contacto en el mismo box (UC5 y UC6).

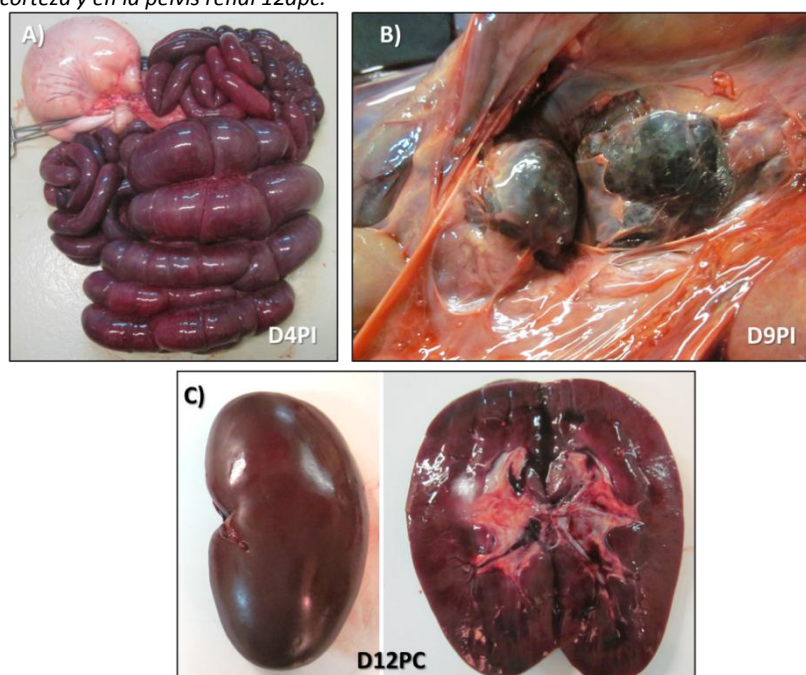
2.2.1. Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia: los síntomas clínicos, fueron evaluados según lo descrito en la tabla II de materiales y métodos. Tanto los animales inoculados como los contactos, presentaron una sintomatología clínica variable. Dos de los animales inoculados murieron el día 4 y 6 pi con síntomas prácticamente inapreciables. Los animales inoculados sacrificados los días 7 y 10 pi presentaron lesiones compatibles con PPA aguda incluyendo fiebre, cianosis, anorexia, postración, letargia, debilidad y síntomas digestivos, como vómitos y/o diarrea. Un comportamiento parecido se observó en los animales contacto que murieron o fueron sacrificados a los días 11 y 12 pc (**figura 25**).

Figura 25 → a) Valoración clínica y b) tasa de supervivencia en el grupo de animales **inoculados** y **contacto**.



2.2.2. Examen *post-mortem* (lesiones macroscópicas): las lesiones macroscópicas estuvieron relacionados con un curso clínico hiperagudo- agudo de PPA. El examen *post-mortem* del animal muerto el día 4pi, que no presentó sintomatología clínica apreciable, reveló la presencia de hemorragias severas en el intestino grueso y delgado (**figura 26a**). A medida que tuvo lugar el transcurso de la enfermedad se empezaron a observar lesiones compatibles con PPA aguda. Los animales, tanto inoculados como contacto, presentaron; esplenomegalia, con el bazo friable y de color rojo oscuro a negro (5/6); linfadenitis hemorrágica en las que los ganglios, con mayor frecuencia los renales y gastro-hepáticos (**figura 26b**) se parecían a coágulos de sangre (6/6); hemorragias, petequias y equimosis en otros órganos tales como riñón (3/6) (**figura 26c**), vejiga (3/6), corazón (2/6), estómago (2/6) y los intestinos (2/6). En la mayoría de los animales el hígado apareció congestivo y aumentado de tamaño (4/6) con hemorragias generalizadas en la vesícula biliar. Otras lesiones macroscópicas encontradas fueron la presencia de hidropericardio (5/6), líquido ascítico (3/6) e hidrotórax (2/6).

Figura 26 → Detalle de lesiones macroscópicas **a)** hemorragias en intestino a 4dpi, **b)** linfadenitis hemorrágica del ganglio gastro-hepático 9dpi y **c)** hemorragias en la corteza y en la pelvis renal 12dpc.



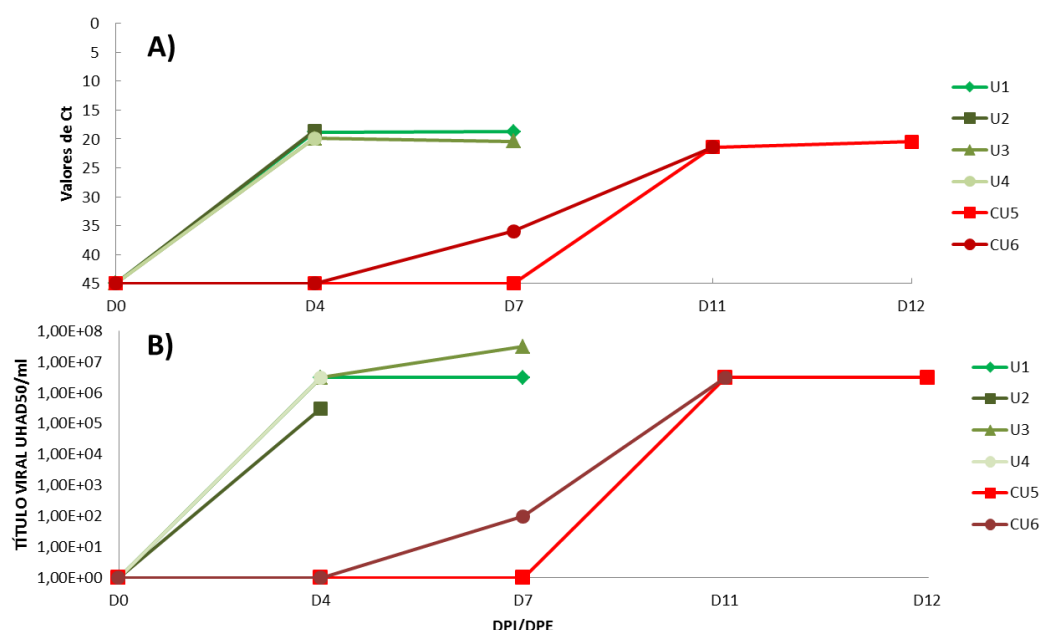
2.2.3. Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral: la viremia se detectó mediante las técnicas de PCR en tiempo real y convencional de la OIE el día 4 pi (primer día de toma de muestras) en todos los animales inoculados (**figura 27a**). Mediante aislamiento viral se calcularon los títulos de virus en suero a 4dpi obteniéndose valores de $3,15 \times 10^{5-6}$ UHAD₅₀/ml y llegando a $3,15 \times 10^{6-7}$ UHAD₅₀/ml el día de la muerte de los animales (**figura 27b**). En los contactos la viremia se detectó también por PCR en tiempo real a 7 y 11 dpc, alcanzando ambos animales títulos en suero de $3,15 \times 10^6$ UHAD₅₀/ml en el día de la muerte.

Asimismo, se encontraron resultados positivos a PCR en todos los órganos recogidos (bazo, corazón hígado, pulmón, riñón, tonsila, y ganglios gastro hepático, mesentérico, retro faríngeo y renal, sub mandibular, esplénico, mediastino, poplíteo e inguinal) de todos los animales, tanto en los inoculados como en los contacto. Los títulos virales en las muestras de bazo determinadas mediante aislamiento viral en cultivo primarios alcanzaron una media de $7,7 \times 10^7$ UHAD₅₀/ml en los animales inoculados y de $1,73 \times 10^8$ UHAD₅₀/ml en los contacto según se puede ver reflejado en la **tabla XXI**.

Tabla XXI → Título de virus obtenidos a partir de los bazos de los animales infectados con el aislado Ukr12/Zapo.

	U1	U2	U3	U4	CU5	CU6
BAZO	$3,15 \times 10^6$ HAD ₅₀ /ml	$3,15 \times 10^5$ HAD ₅₀ /ml	$3,15 \times 10^8$ HAD ₅₀ /ml	$3,15 \times 10^5$ HAD ₅₀ /ml	$3,15 \times 10^7$ HAD ₅₀ /ml	$3,15 \times 10^8$ HAD ₅₀ /ml

Figura 27→ a) Viremia determinada por PCR en tiempo real (OIE-PCR) y **b)** título viral expresado en UHAD50/ml en el grupo de animales **inoculados** y **contacto**.



Con respecto a la respuesta inmune de anticuerpos, ninguno de los animales, ni los inoculados ni los contacto, seroconvirtieron.

2.2.4. Resumen de la experiencia con el aislado Ukr12/Zapo.

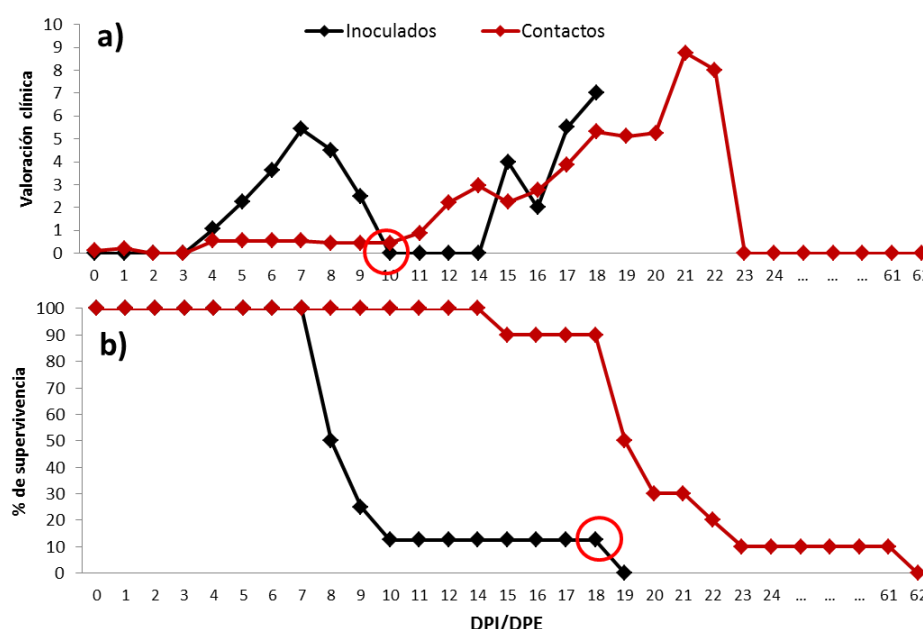
- Todos los animales desarrollaron signos clínicos y lesiones variables asociados a una **forma hiperaguda-aguda de la enfermedad producida por un aislado virulento del vPPA** con una tasa de mortalidad del **100%**.
- La muerte de los animales tuvo lugar entre los días **4 y 10 pi** y **los 11 y 12 dpc**, lo que equivale entre la primera y segunda semana después de la infección.
- La viremia se detectó por las técnicas prescritas por la OIE a día 4 pi en los animales inoculados (primer día de toma de muestras) y a partir del día 11 en los contactos y se mantuvo durante toda la experiencia.
- **No se detectó respuesta de anticuerpos** en ninguno de los animales.

2.3. Infección experimental con el aislado LT14/1490 (Lituania).

Esta infección fue realizada con un total de 18 animales distribuidos en tres boxes diferentes. Ocho de ellos fueron inoculados vía intramuscular con 10 HAD₅₀ del aislado LT14/1490 y los diez restantes se mantuvieron como cerdos contacto.

2.3.1. Sintomatología clínica y porcentaje de supervivencia: los síntomas clínicos, fueron evaluados según lo descrito en la tabla II de materiales y métodos. Los animales inoculados (7/8) presentaron sintomatología clínica característica de PPA aguda a partir del cuarto dpi siendo sacrificados entre el día 7 y 9 pi. Uno de los cerdos inoculados (L6) mostró sin embargo un retraso en la aparición de la enfermedad semejante a la observada en los animales contacto, que murieron o fueron sacrificados entre los 14 y los 22 dpc. Hay que destacar que uno de los cerdos contacto (L18) permaneció asintomático durante toda la infección experimental siendo sacrificado en el día 61 pc. Tanto los animales inoculados (8/8) cómo los contactos (9/10) desarrollaron patrones clínicos similares, y murieron o fueron sacrificados 3-4 días después de la aparición de los signos clínicos. La sintomatología clínica estuvo caracterizada principalmente por un síndrome febril con anorexia leve, letargo, debilidad y postración (17/18). Otros signos clínicos relacionados con la PPA aguda fueron; i) áreas hemorrágicas (equimosis, petequias) en orejas (13/18) y/o el abdomen (6/18), ii) descargas oculares (11/18), iii) cianosis (3/18) y iv) diarrea hemorrágica (3/18)

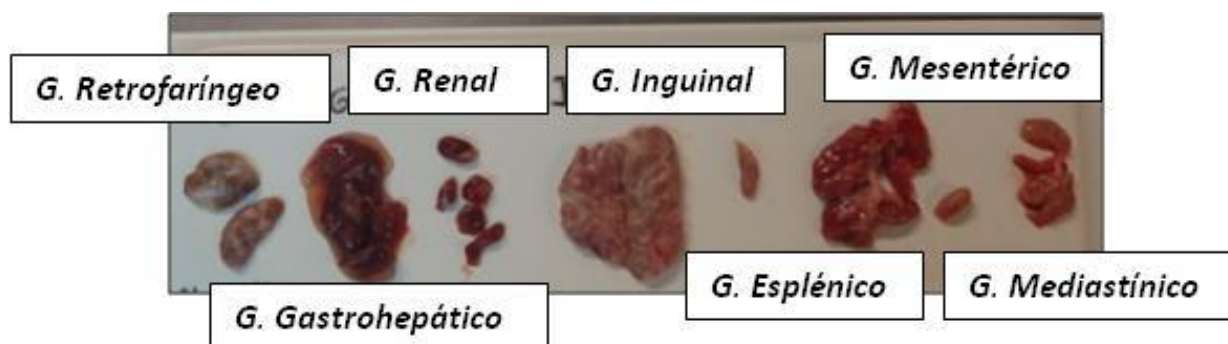
Figura 28 → a) Media de la valoración clínica, y **b)** tasa de supervivencia en el grupo de animales **inoculados** y **contacto**. En un círculo en rojo figura el animal L6, que a pesar de ser inoculado presentó un patrón de infección semejante a los animales contacto (infección natural).



2.3.2. Examen post-mortem (lesiones macroscópicas): el examen post-mortem de los animales muertos o sacrificados dentro de los 22 dpi/dpc, reveló la presencia de lesiones internas características de PPA aguda, con hemorragias subcutáneas, esplenomegalia moderada y ganglios agrandados y muy hemorrágicos, principalmente el gastrohepático, el submandibular y el mesentérico, y en menor medida los ganglios renal y mediastínico.

La mayoría de los animales presentaron hidropericardio con líquido amarillento, ascites, hígado agrandado y congestivo y hemorragias petequiales en la pelvis y la corteza renal, en estómago e intestino (delgado y grueso), en la vesícula biliar, la vejiga urinaria y en la tonsila. En menor medida se registraron petequias en pulmón y en corazón.

Figura 29 → Detalle de las lesiones hemorrágicas en los ganglios extraídos a uno de los animales infectados con el aislado LT14/1490: ganglios: retro faríngeo, renal, mesentérico y gastro-hepático agrandados y completamente hemorrágicos; inguinal agrandado y sólo parcialmente hemorrágico y esplénico y mediastino únicamente agrandados.



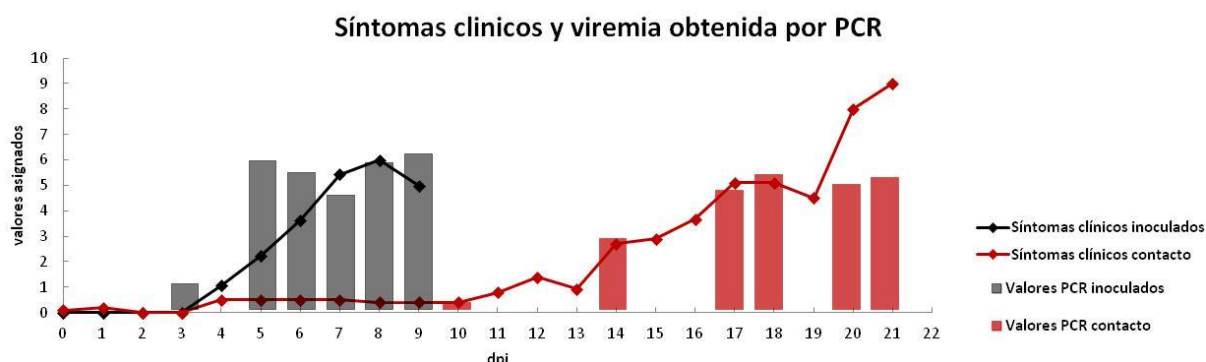
La necropsia a los 61 dpc del animal contacto que permaneció asintomático durante todo el transcurso de la infección, reveló esplenomegalia hiperémica, petequias en los pulmones y ganglios linfáticos moderadamente agrandados y hemorrágicos (**figura 30**).

Figura 30 → Detalle de la esplenomegalia hiperémica encontrada en el animal contacto CL18 sacrificado el día 61 pc.



2.3.3. Determinación de la viremia, carga viral en tejidos y respuesta humoral: En siete de los ocho cerdos inoculados, el genoma del vPPA se detectó por primera vez en la sangre mediante la técnica de UPL- PCR en tiempo real (Fernández-Pinero y *col*, 2013) a los $3,75 \pm 1,4$ dpi. En consonancia con la clínica observada, en el animal inoculado L6 no se detectó viremia hasta el 14 dpi siguiendo el mismo patrón que los animales infectados por contacto, en los que se detectó por primera vez el genoma del vPPA a los $13,7 \pm 2,8$ dpc (**figura 31**). Los títulos máximos de virus en sangre que oscilaron entre los $10^{6,4}$ y $10^{8,7}$ UHAD₅₀ / ml, se registraron a las 6 dpi y a los 14 dpc en los animales inoculados y en contacto, respectivamente. El genoma del virus se detectó en todos los órganos y tejidos analizados.

Figura 31 → Evolución de los síntomas clínicos de los dos grupos de animales infectados con el aislado lituano LT14/1490 considerando el L6 (inoculado) como parte del grupo de contacto en comparación con la viremia obtenida mediante PCR en tiempo real (UPL-PCR).



El cerdo contacto que permaneció asintomático a lo largo del experimento mostró picos de viremia intermitentes y débiles a los 17, 34 y 38 dpc. El análisis de los tejidos permitió la detección del genoma viral en 9 de los 20 tejidos analizados incluyendo la médula ósea, los tejidos articulares, bazo, pulmón y los ganglios linfáticos esplénicos, renales y submandibulares. Sin embargo no se pudo aislar virus en las muestras positivas a PCR de este animal después de tres pases en cultivos primarios.

En 6 de los 18 animales (33 %) se obtuvo un resultado positivo en anticuerpos entre los 17 y los 21 dpi/dpc mediante la técnica de IPT (**tabla XXII**). Hay que destacar que utilizando las técnicas prescritas por la OIE y/o la técnica del ELISA de INGENASA sólo en dos animales (11%) se obtuvo un resultado positivo. No se observó ninguna respuesta de anticuerpos en el cerdo superviviente. También se obtuvieron resultados positivos en IPT en los exudados de tejidos de 5 de los 6 animales que seroconvirtieron: en pulmón (5/ 9), bazo (5/6), riñón (4/6) y algo menos en hígado, corazón, diafragma y líquidos articulares (2/6 en todos los casos).

Tabla XXII → Detección de anticuerpos frente al vPPA. Resultados comparativos obtenidos mediante IPT y ELISA en las muestras de suero obtenidas a distintos dpi/dpc en los animales que seroconvirtieron. En gris claro se indica el resultado positivo inicial mediante PCR.

positivo inicial mediante PCR.										
IDENTIFICACIÓN ANIMAL	TÉCNICA SEROLÓGICA	DPI/DPC								
		0	3	7	10	14	17	18	20	21
CONTACTO L2	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NM*	NEG	POS
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NM*	NEG	NEG
INOCULADO L6	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
CONTACTO L10	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
CONTACTO L11	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS	POS		
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		
CONTACTO L12	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG		
CONTACTO L15	<i>IPT</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		
	<i>ELISA</i>	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS		

*NM (muestra no disponible)

2.3.4. Resumen de la experiencia con el aislado LT14/1490:

- 17/18 animales presentaron sintomatología clínica característica de **PPA aguda** causada por **virus virulentos**, con una **mortalidad del 94,5%**.
- Tras un **periodo de incubación de 4-5 días**, 7 de los 8 animales inoculados desarrollaron sintomatología clínica característica de PPA aguda que dio lugar a la aparición de animales muertos o moribundos entre el día 7 y 9 pi. Uno de los cerdos inoculados mostró un retraso en la aparición de la enfermedad semejante a la observada en los animales contacto apareciendo las primeras manifestaciones clínicas una semana después de haberse producido la infección primaria. La muerte o sacrificio de los animales en contacto tuvo lugar principalmente entre el día 18 y 22 pc.
- La viremia se detectó entre los días 3 y 7 pi en los animales inoculados y entre los días 10 y 17 pc en los contacto y se mantuvo durante toda la experiencia.
- Se detectó respuesta de anticuerpos en el 33% de los animales mediante IPT.
- Uno de los animales sobrevivió a la infección, mostrando picos débiles e intermitentes de viremia y presencia del genoma viral en tejidos, aunque el virus no pudo ser aislado.

3. Evaluación de técnicas de diagnóstico de PPA para la detección de la enfermedad en el este de Europa.

La situación actual de la PPA en la UE ha creado la necesidad de realizar una revisión de la sensibilidad y especificidad de las técnicas de diagnóstico actuales de PPA y su capacidad para detectar el vPPA, tanto en cerdos domésticos como jabalíes europeos, en las zonas afectadas. Con este fin, dentro de esta tesis se ha realizado, en colaboración con los LNR (laboratorios nacionales de referencia) de los cuatro países afectados de la UE, un estudio comparativo de las técnicas de diagnóstico de PPA que actualmente se están utilizando en la UE.

Para ello se analizaron **un total de 1274 muestras** que comprendían muestras de campo recogidas de los brotes ocurridos en los países afectados de la UE en 2014 y muestras experimentales de animales infectados con aislados del vPPA pertenecientes al genotipo II. El objetivo fundamental ha sido determinar las herramientas de diagnóstico más adecuadas para ser aplicadas en el escenario que encontramos actualmente en el este de Europa.

3.1. Técnicas de detección de virus: PCRs, ELISA de antígeno y aislamiento viral.

Para realizar el estudio comparativo de las técnicas de PCR para la detección del genoma del vPPA, se seleccionaron un total de **895 muestras de sangre y tejidos** según se describe en el apartado 5.3.1. de materiales y métodos. Las muestras se analizaron en paralelo mediante las técnicas de PCR prescritas por la OIE (la PCR convencional descrita por Agüero en 2003 y la PCR en tiempo real descrita por King en 2003) y la técnica de UPL-PCR descrita por Fernández-Pinero en 2013.

Además, **272 muestras de sangre y tejido** se analizaron en paralelo utilizando el ELISA de antígeno comercial (Ingenasa-Ingezim PPA DAS K2; Ingenasa, Madrid, España) según lo especificado en el apartado 5.3.1. de materiales y métodos.

3.1.1. Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR y el ELISA de antígeno.

3.1.1.1. Muestras experimentales.

- a) Muestras de sangre: Del total de las 150 muestras de sangre analizadas, el 41,3% dieron un resultado positivo al ser analizadas con la UPL-PCR (62 muestras), mientras que el 39,9% (59 muestras) y el 34,7% (52 muestras) lo hicieron al ser analizadas con las PCRs en tiempo real y convencional de la OIE, respectivamente. Al analizar estas mismas muestras con el ELISA de antígeno, 48 dieron un resultado positivo, lo que supone un 32% del total (ver **tabla XXIIIa**).

Tomando como referencia los valores obtenidos con la UPL-PCR, se observó una correlación casi perfecta entre los resultados obtenidos con la UPL-PCR y la PCR en tiempo real de la OIE ya que con esta última sólo se obtuvieron tres falsos negativos. En los tres casos fueron muestras con valores de Ct muy altos ($Ct > 36$), obtenidas a días 17, 34 y 38 pc del animal que permaneció asintomático durante la infección experimental con el aislado LT14/1490.

La correlación entre los resultados obtenidos con la UPL-PCR y la PCR convencional y el ELISA de antígeno fue moderadamente buena: se encontraron 10 falsos negativos con la primera y 14 con la segunda, que corresponden a muestras recogidas a tiempos tempranos de infección con valores de $Ct > 30$.

- b) **Muestras de tejidos:** De los 450 tejidos, el 97,8% dio un resultado positivo al ser analizados con la UPL-PCR, porcentaje que se redujo al 96,6% (435 muestras) cuando se analizaron con las dos PCRs prescritas por la OIE. Los quince tejidos con resultado falso negativo fueron obtenidos de dos cerdos contacto de la experiencia con el aislado LT14/1490. Los bazos de los 30 animales se analizaron utilizando el ELISA de antígeno, siendo el 93,3% (28) positivos mediante esta técnica (**tabla XXIIIb**).

Tabla XXIII→ Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR en tiempo real (UPL-PCR y OIE-PCR), la PCR convencional de la OIE y el ELISA comercial de antígeno para la detección del vPPA en muestras de sangre (a) y tejidos (b) obtenidos de animales infectados experimentalmente con aislados del genotipo II.

(a) Resultados comparativos en muestras de sangre										
AISLADO VIRAL	Nº ANIMALES ANALIZADOS	Nº SANGRES ANALIZADAS	UPL-PCR		OIE TIEMPO REAL PCR		OIE CONVENCIONAL PCR		Ag-ELISA (INGENASA)	
			Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%
Ukr12/Zapo	6	19	10/19	52.6	10/19	52.6	10/19	52.6	9/19	47.3
Arm07	6	20	10/20	50	10/20	50	10/20	50	10/20	50
LT14/1490	18	111	42/111	37.83	39/111	35.13	32/111	29.8	29/111	26.12
TOTAL	30	150	62	41.3	59	39.3	52	34.7	48	32.0

(b) Resultados comparativos en muestras de tejidos										
AISLADO VIRAL	Nº ANIMALES ANALIZADOS	Nº TEJIDOS ANALIZADAS	UPL-PCR		OIE TIEMPO REAL PCR		OIE CONVENCIONAL PCR		Ag-ELISA (INGENASA)	
			Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%	Nº positivos	%
Ukr12/Zapo	6	90	90/90	100	90/90	100	90/90	100	6/6*	100
Arm07	6	90	90/90	100	90/90	100	90/90	100	6/6*	100
LT14/1490	18	270	260/270	96.29	255/270	94.4	255/270	94.4	16/18*	88.8
TOTAL	30	450	440	97.8	435	96.6	435	96.6	28	93.3

* En el ELISA de Ag se incluyeron las mismas muestras de sangre que en las PCRs (19, 20 y 111) y las muestras de bazo de cada uno de los animales sacrificados.

3.1.1.2. Muestras de campo.

De las 295 muestras de campo analizadas, en el 100% se obtuvo un resultado positivo mediante la UPL-PCR, mientras que al ser analizadas con la PCR en tiempo real prescrita por la OIE, este porcentaje disminuyó hasta el 98,64% (291 muestras). Los cuatro falsos negativos corresponden a una muestra de sangre, una de suero y dos de médula ósea con valores de Ct superiores a 35. Los resultados obtenidos con la PCR convencional de la OIE revelaron un total de 285 muestras positivas, lo que supone un 96,3% del total. En esta ocasión los falsos negativos se corresponden a muestras con valores de Ct superiores a 30.

Para evaluar el ELISA de antígeno en la detección del vPPA en muestras de campo, se analizaron 92 muestras que comprendieron 67 bazos y 25 sangres previamente clasificadas como positivas con la UPL-PCR. De ellas el 71,74% dieron un resultado positivo, porcentaje que corresponde a 52 muestras de bazo y 14 de sangre (ver **tabla XXIV**).

Tabla XXIV→ Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de PCR en tiempo real (UPL-PCR y OIE-PCR), la PCR convencional de la OIE y el ELISA comercial de antígeno para la detección del vPPA en muestras de campo.

Tipo de muestras	PCR							ELISA- Ag (Ingenasa)		
	Total muestras analizadas	UPL		TIEMPO REAL OIE		CONVENCIONAL OIE		Total muestras analizadas*	Muestras positivas	%
		Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%			
Tejidos	252	252	100%	250	99,2%	246	97,6%	67	52	77,6%
Sangre-EDTA	39	39	100%	38	97,4%	36	92,3%	25	14	56%
Suero	2	2	100%	1	50%	0	0	-	-	
Fluido	2	2	100%	2	100%	2	100%	-	-	
Total	295	295	100%	291	98,6%	284	96,3%	92	66	71,2%

3.1.1.3. Análisis de los resultados.

Tomando como método de referencia la UPL-PCR, capaz de detectar el genoma del vPPA en el 100% de los animales infectados o expuestos, se calcularon los porcentajes de sensibilidad del resto de las técnicas empleadas. El porcentaje de sensibilidad de la PCR en tiempo real prescrita por la OIE fue de 98,5%, IC del 95% [97,4; 99,1] con 12 muestras falso negativas de un total de 291 muestras positivas. Al analizar las muestras con la PCR convencional de la OIE, el número de falsos negativos se incrementó hasta 26, dando lugar a un porcentaje de sensibilidad del 96,7%, [IC del 95% [95,3; 97,8], mientras que al hacerlo con el ELISA de antígeno la sensibilidad observada disminuyó hasta el 77,2% IC del 95% [70,6; 82,6].

Tabla XXV→ Resultados comparativos de sensibilidad (Ss) obtenidos utilizando las técnicas de PCR prescritas por la OIE y el ELISA de antígeno comercial en el análisis de 797 muestras, de campo y experimentales clasificadas cómo positivas mediante la técnica de UPL-PCR.

TIPO DE MUESTRAS	OIE –PCR tiempo real		OIE – PCR convencional		Ag-ELISA INGENASA	
	Nº positivos/total	%Ss [95% CI]	Nº positivos/total	%Ss [95% CI]	Nº positivos/total	%Ss [95% CI]
EXPERIMENTALES	494/502	98.4	487/502	97,0	76/92	82.6
CAMPO	291/295	98.6	284/295	96,3	66/92	71.7
TOTAL	785/797	98,5 [97.4 to 99.1]	771/797	96,7 [95.3 to 97.8]	142/184	77,2 [70.6-82.6]

Considerando todas las muestras analizadas, el grado de concordancia alcanzado entre la UPL-PCR y las PCRs prescritas por la OIE fue casi perfecto, con un valor de $\kappa = 0,94$ IC del 95% [0,91; 0,97] al comparar la PCR en tiempo real y un valor de $\kappa = 0,88$ IC del 95% [0,83; 0,92] al hacerlo con la convencional. Por otra parte, la concordancia entre la UPL-PCR y el ELISA de antígeno se puede considerar buena, con un valor de $\kappa = 0,67$ IC del 95%, [0,58; 0,76]

3.1.2. Resultados comparativos obtenidos mediante la técnica de UPL-PCR y el aislamiento viral.

De las 502 muestras experimentales de sangre y tejido positivas en UPL-PCR, se consiguió aislar el vPPA tras tres pases sucesivos en cultivo primario de leucocitos y/o macrófagos en el 96,8% de los casos (486 muestras), que mostraron el típico patrón hemoabsorbente. Las 16 restantes, en las que no se detectó virus viable, fueron recogidas principalmente en la etapa inicial de la experiencia con el aislado LT14/1490 y presentaron valores elevados de Ct: $32,5 \leq Ct \leq 39,5$.

Sin embargo, de las 185 muestras de campo seleccionadas para aislamiento, sólo se consiguió aislar el virus en 77 (41,62%). Hay que destacar que la mayoría de las muestras en las que obtuvo un resultado negativo, eran procedentes de jabalí, de los que sólo se consiguió aislamiento positivo en 27 de los 91 animales analizados (30,7%). Sin embargo de las muestras de cerdo doméstico recibidas, representativas de un total de 34 animales, se obtuvieron un total de 29 aislados, lo que supone un 86% del total de las muestras de doméstico recibidas del campo. En este caso, no fue posible establecer una correlación entre los valores de Ct obtenidos con la UPL-PCR y el resultado negativo en aislamiento.

3.2. Técnicas de detección de anticuerpos: ELISAs e IPT.

Para realizar el estudio comparativo de las técnicas de detección de anticuerpos específicos frente al vPPA, se seleccionaron inicialmente un total de **171 muestras de sueros** según se describe en el apartado 5.3.2. de materiales y métodos. Las muestras se analizaron en paralelo mediante las técnicas del ELISA indirecto prescrito por la OIE, los tres ELISAs comerciales disponibles en el mercado ([®]Ingezim PPA Compac K3, de Ingenasa, ID Screen[®] African Swine Fever Indirect, de IdVet y SVANOVIR[®] ASFV-Ab de Svanova) y la inmunoperoxidasa indirecta (IPT), validada por el EURL en el año 2012.

Para el estudio de evaluación de detección de anticuerpos sobre muestras **de sangre y exudados de tejidos**, se incluyeron inicialmente 90 muestras procedentes de las infecciones experimentales con los aislados del genotipo II y un panel de 210 exudados negativos al vPPA que fueron analizados en paralelo con las técnicas de ELISA e IPT. Finalmente mediante la técnica de IPT se analizaron 167 muestras de campo obtenidas en 2014 de animales infectados en zonas de la UE (apartado 5.3.2. de materiales y métodos.).

3.2.1. Resultados comparativos obtenidos en muestras de suero.

3.2.1.1. Muestras experimentales.

De los 30 animales infectados, en 7 se detectó una respuesta a anticuerpos mediante la IPT (23,3 % del total de animales). Sin embargo utilizando el ELISA de Ingenasa el número de animales disminuyó a 3 (10%) y a 2 utilizando los ELISAS de la OIE, IdVet y Svanova.

De los 150 sueros analizados 8, obtenidos todos ellos entre los días 16 y 21 pi/pc, dieron un resultado positivo al ser analizados con la IPT (5,33%), mientras que sólo 3 (2%) lo hicieron al ser analizados con el ELISA de Ingenasa y 2 (1,3%) con el resto de los ELISAs (ver **tabla XXVI**).

Tabla XXVI → Resultados comparativos obtenidos mediante las técnicas de ELISA en los sueros experimentales clasificados como positivos mediante la IPT

Aislado del vPPA	Id Animal	DPI/DPC*	IPT	ELISA Ingenasa	ELISA IdVet	ELISA Svanova	ELISA OIE
Arm07	Cerdo contacto 5	16	POS	POS	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Inoculado 6	18	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Cerdo contacto 2	21	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Cerdo contacto 10	17	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Cerdo contacto 11	17	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Cerdo contacto 11	18	POS	POS	POS	POS	POS
LT14/1490	Cerdo contacto 12	18	POS	NEG	NEG	NEG	NEG
LT14/1490	Cerdo contacto 15	17	POS	POS	POS	POS	POS
Total sueros de animales seroconvertidos		8	8/8	3/8	2/8	2/8	2/8

*DPI (días post infección)/DPC (días post contacto).

3.2.1.2. Muestras de campo.

21 sueros de campo se analizaron en paralelo con las cinco técnicas seleccionadas. Al igual que lo observado en el punto anterior, 10 de 21 muestras resultaron positivas con la IPT (47,62%), mientras que el porcentaje disminuyó considerablemente al ser analizados con los ELISAs. En concreto el número de positivos mediante ELISA fue de; 6 (37,5%) con el ELISA de Ingenasa, 4 (25%) con el ELISA de IdVet y Svanova, y 2 (9,52%) con el ELISA de la OIE (**tabla XXVII**).

Tabla XXVII → Resultados comparativos obtenidos en el análisis de 21 sueros de utilizando cada uno de los ELISAS y la IPT.

Sueros de campo	Muestras totales	IPT		ELISA Ingenasa		ELISA IdVet		ELISA Svanova		ELISA OIE	
		Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%
Recibidos	21	10	47,6%	6	37,5%	4	25%	4	25%	2	9,5%
Positivos en IPT	10	10	100%	6/10	60%	4/10	40%	4/10	40%	2/10	20%

En las muestras positivas se calcularon los títulos de anticuerpo en IPT mediante diluciones en base dos, comenzando en 1:20. Los resultados mostraron que la falta de sensibilidad demostrada por los ELISAs se debía a los bajos títulos que presentaban las muestras de suero. Así, el ELISA de Ingenasa no detectó los anticuerpos con títulos inferiores a 1:640, los ELISAs de IdVet y Svanova por debajo de 1:2510 y el ELISA de la OIE por debajo de 1:20480.

3.2.1.3. Análisis de los resultados.

Asumiendo la IPT como método de referencia, y considerando los resultados de todas las muestras analizadas, se obtuvieron 14 falsos negativos al utilizar el ELISA de la OIE (sobre un total de 18 muestras positivas), 12 utilizando los ELISAs de IdVet y Svanova y 9 utilizando el ELISA de Ingenasa. Los valores de sensibilidad oscilaron entre el 22,22% con el ELISA-OIE hasta un 50% con el ELISA de Ingenasa, mostrando unos valores de concordancia (Kappa) entre 0,3494 IC del 95% [0,01 a 0,67] y 0,64 IC del 95% [0,01 a 0,67], entre la IPT y los ELISAs. De todas formas hay que considerar estos datos con precaución, dado el bajo número de muestras utilizado.

3.2.2. Evaluación de la detección de anticuerpos en muestras alternativas de sangre y exudado de tejidos.

De los 90 exudados obtenidos de animales infectados, 25 dieron un resultado positivo al ser analizados con el ELISA de Ingenasa. Esto representa a 18 de los 30 animales infectados. Por IPT el número de positivos fue 20 (10 animales), con el ELISA de la OIE = 6 (5 animales), con el ELISA de Svanova = 6 muestras (3 animales) y con el de IdVet se detectaron 3 muestras positivas correspondientes a 2 animales.

Para determinar la especificidad de los resultados obtenidos en el análisis de las muestras experimentales, se analizaron en paralelo con las cinco técnicas, un panel de 210 exudados de bazo, pulmón e hígado negativos, obtenidos de 70 cerdos domésticos no infectados con el vPPA. Tanto la IPT como el ELISA de IdVet mostraron una especificidad del 100%. Sin embargo el número de falsos positivos se incrementó hasta 5, 18 y 33 al ser analizados con el ELISA de la OIE, el ELISA de Svanova y con el ELISA de Ingenasa respectivamente. Esto dio lugar a uno porcentaje de especificidad de sólo el 84,3% mediante el ELISA de Ingenasa. Los

falsos positivos se obtuvieron principalmente en muestras muy hemolizadas procedentes de bazos (72,7% de falsos positivos) e hígado (24,2% de falsos positivos) (ver **tabla XXVIII**).

Aunque el ELISA de Ingenasa presentó los mayores porcentajes de sensibilidad, combinando los resultados de especificidad (84,3%) con los valores predictivos positivo (VPP= 17,2%) y negativo (VPN =95,9%) hacen que la exactitud del ELISA sea del 80,7% en comparación con la IPT en la clasificación de una muestra como positiva o negativa.

Tabla XXVIII → Número de muestras positivas procedentes de animales infectados vs muestras positivas procedentes de animales no infectados utilizando cada una de las técnicas evaluadas.

Exudados experimentales	Muestras totales	IPT		ELISA Ingenasa		ELISA IdVet		ELISA Svanova		ELISA OIE	
		Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%	Muestras positivas	%
Animales infectados	90	20	22,2%	25	27,7%	3	3,3%	6	6,7%	6	6,7%
Animales no infectados	210	0	FP=0	33	FP=15,7%	0	FP=0	18	FP=8,6%	5	FP=2,4%

3.2.2.1. Muestras de campo.

A partir de los resultados obtenidos en las muestras experimentales, se seleccionó la IPT como técnica elección para el análisis de las 167 muestras de campo recogidas de los brotes ocurridos en el este de Europa y representativas de un total de 51 jabalíes y 32 cerdos domésticos. En 87 de las 167 muestras analizadas (52%) se detectó una respuesta específica de anticuerpos. Estas 87 muestras correspondieron a 30 jabalíes (58,8%) y a 11 cerdos domésticos (34,37%). Mediante diluciones en base dos se calcularon los títulos de anticuerpos en las muestras positivas, que oscilaron entre 1:1280 hasta 1:40960 en nueve de los 30 jabalíes positivos, mientras que los títulos obtenidos en las muestras de cerdo doméstico fueron más bajos y sólo tres de ellos presentaron títulos superiores a 1:1280.

DISCUSIÓN

Desde que la PPA hizo su entrada en Georgia en junio del 2007 y posteriormente en la Federación Rusa (FR) a finales del mismo año, se ha extendido siguiendo los cuatro puntos cardinales hasta llegar por el norte a la península de Kola, por el sur hasta Irán, por el este hasta el Distrito del Volga, y por el oeste más allá de las fronteras de la FR, llegando a Ucrania y Bielorrusia en 2012 y 2013. A principios del 2014, la PPA se propagó a los países del este de la UE, Polonia, Estonia, Letonia y Lituania, afectando tanto a cerdo doméstico como a las poblaciones de jabalíes europeos, lo que ha desembocado en la situación actual, que, lejos de estar controlada, continúa su tendencia a la expansión. En la FR se han descrito dos zonas endémicas diferenciadas y distantes entre sí: la zona del Cáucaso (Distritos Sur y Cáucaso Norte), y la zona del Tver, dentro del Distrito Central (Rahimi y *col.*, 2010; Gulenkin y *col.*, 2011; Gogin y *col.*, 2013; Oganessian y *col.*, 2013; Gallardo y *col.*, 2014a, 2015a; Decisión de la Comisión 2014/709/UE). Estas zonas endémicas han generado una cierta controversia ya que algunos autores defendían lo improbable de esta situación debido a la virulencia de los aislados circulantes, y otros han demostrado mediante un análisis espacio-temporal que la situación en el sur de la FR aún es compatible con una situación epidémica (Gabriel y *col.*, 2011; Jori y *col.*, 2013; Blome y *col.*, 2012, 2013; Llinge y *col.*, 2014). A pesar de todo ello, ambas zonas están consideradas hoy día como endémicas por la UE (Decisión de la Comisión 2014/709/UE).

Muchos han sido los factores que han permitido esta rápida expansión. Durante los 8 años que lleva la PPA en la FR, la transmisión por contacto con cerdos infectados o por la alimentación con desperdicios, favorecido por el gran volumen de comercio ilegal y la ganadería tradicional de traspato, se perfilan como los principales factores que han influido en su difusión (EFSA 2010; Beltrán-Alcrudo y *col.*, 2009; Oganessian y *col.*, 2013, Gogin y *col.*, 2013). Una secuencia posible para el establecimiento del virus en una determinada zona podría ser la siguiente: los brotes primarios se producirían mayoritariamente en las pequeñas explotaciones de traspato y de ahí, el virus se propagaría a la vida silvestre, pudiendo circular entre ambas poblaciones quedando establecido así un ciclo doméstico-silvestre en el que el jabalí está jugando un importante papel en su mantenimiento y transmisión a países limítrofes, como ya ha sido demostrado. No está muy claro si por sí mismo el jabalí puede mantener la infección en ausencia de reinfecciones, sobre todo en zonas de baja densidad (Jori y Bastos, 2009; Giammarioli y *col.*, 2011; Mur y *col.*, 2012a; Oganessian y *col.*, 2013; Gogin y *col.*, 2013; Costard y *col.*, 2013b; Iglesias y *col.*, 2015). A pesar de que es la hipótesis más aceptada en la actualidad, estudios recientes realizados sobre las rutas de transmisión en las regiones del Tver y Krasnodar, sugieren que aunque sí existe una dependencia entre los brotes ocurridos en cerdo doméstico y los casos en jabalí en la región del Tver, éstos son independientes en la región de Krasnodar (Vergne y *col.*, 2015). De hecho, en la FR el porcentaje de casos en jabalí ha sido mucho menor que en cerdo doméstico. Un estudio realizado sobre el papel de ambos hospedadores en la propagación de la enfermedad en la FR entre los años 2007 y 2013 muestra que, el porcentaje de focos atribuibles a jabalíes es menor que el número de focos atribuibles a cerdo doméstico,

hechos que apoyan el papel “secundario” de jabalí en la propagación de la PPA en la FR (EFSA, 2010; Iglesias y *col.*, 2014; OIE, Informe de situación 2015). Sin embargo, este papel pasa a un primer plano cuando hablamos de la UE. Desde su entrada en Lituania, el número de casos ocurridos en jabalí ha supuesto más del 90% del número total de focos dentro del territorio de la UE y de hecho, en todos los países afectados el jabalí ha sido el elemento clave de entrada. En Lituania y Polonia los primeros focos declarados en enero y febrero del 2014, estuvieron relacionados con la aparición de jabalíes muertos, en regiones próximas a Bielorrusia, a escasos km de la frontera (Gallardo y *col.*, 2014a). También en Estonia, 9 meses más tarde, se declaró el primer caso de PPA en un jabalí encontrado muerto en la frontera con Letonia. Todos ellos se asociaron al movimiento transfronterizo de animales infectados. En Letonia, las primeras notificaciones se declararon en cerdo doméstico y en jabalí en el mismo día. En este caso, y aunque no hay suficiente información, parece que el origen del primero tuvo lugar en el transporte de productos porcinos contaminados, mientras que el origen del segundo se relacionó con el movimiento de jabalíes infectados a través de la frontera con Bielorrusia. Basándonos en la información molecular disponible y en los hallazgos epidemiológicos, a pesar de que Bielorrusia sólo ha declarado dos focos en cerdo doméstico, parece que los aislados Bielorrusos podrían ser el origen de los que actualmente circulan dentro de la UE siendo el movimiento de jabalíes en las fronteras el vehículo más probable de entrada (Gallardo y *col.* 2014a).

Una vez que la enfermedad ha sido detectada en los países afectados, y a excepción de Polonia donde todos los casos se han mantenido restringidos a la provincia de Podlaskie, su expansión se mantiene a través de jabalíes sobre todo a nivel local. En la transmisión a grandes distancias es el factor antropogénico el que se baraja como más probable. Asimismo, en todos los países afectados dentro de la UE el número de casos en jabalíes es mucho mayor (de un 3 a un 9% dependiendo del país) que el número de brotes en cerdos domésticos. De hecho, en Estonia no se había registrado ningún caso en doméstico hasta julio del 2015. Esto puede deberse a un mayor control tanto por parte de los gobiernos y de la UE, con una legislación específica y el establecimiento de la regionalización en función de las diferentes situaciones epidemiológicas.

1. Evolución de la PPA en el este de Europa.

1.1. Cambios en la enfermedad observados a través de los resultados de las pruebas diagnósticas.

Algunos investigadores defienden que no se han detectado cambios significativos en el patrón patológico y epidemiológico de la PPA en los años en los que lleva presente en la FR y en los países del Cáucaso y que ésta continúa presentando las características típicas de un curso agudo causado por aislados virulentos, con una elevada mortalidad tanto en jabalí como en cerdo doméstico (Belyanin y *col.*, 2011; Gogin y *col.*, 2013; Gabriel y *col.*, 2011; Blome y *col.*,

2012, 2013; Guinat y *col.*, 2014). Aunque no se ha demostrado la presencia de animales recuperados que darían lugar a formas subclínicas de la enfermedad, no es posible excluir su existencia ya que, por una parte, los animales asintomáticos no son detectables mediante inspección clínica y por otra, en la FR no ha existido vigilancia activa basada en el diagnóstico serológico hasta principios de 2014. Por lo tanto no es posible ni confirmar ni desmentir la existencia de estos animales asintomáticos entre los años 2007 y 2014 (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2012b; Gogin y *col.*, 2013; Mur y *col.*, 2014b).

De hecho, y a pesar de toda la información que nos ofrece la presencia de anticuerpos acerca de los tiempos de infección, hemos tenido que esperar hasta el año 2014 para ver publicaciones con los resultados serológicos de análisis de muestras de campo (Kurinnov y *col.*, 2014; Mur y *col.*, 2014b; Gallardo y *col.*, 2014 a, b, c; 2015 a, b). En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis mediante el análisis de 350 animales procedentes de los países afectados del este de Europa, incluidos los de la UE, revelaron la presencia de anticuerpos en el 50,9% de los animales analizados. Si este porcentaje se desglosa en jabalí y cerdo doméstico, el 53,3% de los jabalíes analizados mostraron respuesta específica de anticuerpos frente al virus mientras que en el caso de los cerdos domésticos el porcentaje fue del 42,3%. En relación al título de anticuerpos, el 44,1% de los jabalíes positivos presentó títulos superiores a 1:1280, mientras que sólo el 15,1% de los 33 cerdos domésticos positivos en serología alcanzó ese título. Estas diferencias pueden ser debidas a las medidas sanitarias adoptadas en una explotación cuando se detecta un animal positivo que implica el sacrificio masivo de todos los animales de la misma, mientras que el control de los jabalíes conlleva más complicaciones (Gallardo y *col.*, 2014b y 2015a).

Un resultado interesante que merece la pena destacar, es que el 27% de los jabalíes que seroconvirtieron fueron negativos o positivos débiles mediante PCR. Esto representa un 14% del total de jabalíes en los que se confirmó la presencia de la infección. Todos ellos se obtuvieron de muestras recogidas de los casos ocurridos en el año 2015, lo que parece indicar que existe una evolución en la dinámica de la infección en los países de la UE con un incremento en el número de animales que sobrevive el tiempo necesario para generar anticuerpos.

Estudios previos realizados entre los años 2013 y 2014 ya habían puesto de manifiesto la existencia de animales seropositivos en determinadas regiones de la FR (Kurinnov y *col.*, 2014; Mur y *col.*, 2014b). En la región de Smolensk, en la frontera con Bielorrusia, se realizó un estudio en 2014 que incluyó más de mil muestras obtenidas de jabalí. El 7% del total de animales fue positivo a PPA y de ellos, el 21% lo fue únicamente por un resultado positivo en anticuerpos, ya que el resultado de los test de PCR fue negativo (Kurinnov y *col.*, 2014). Por otra parte, Mur y *col.* (2014), evaluaron la presencia de anticuerpos frente al vPPA mediante ELISA e Inmunoblotting en muestras tanto experimentales como de campo, recogidas en la FR entre los años 2013 y 2014. Las muestras de campo analizadas se refirieron principalmente a muestras

de suero de cerdo doméstico y de ellos, el 2,2% dieron un resultado positivo. Además, se analizaron 39 exudados (32 de cerdo doméstico y 7 de jabalí) de los que 5 también dieron resultado positivo a anticuerpos. Estos dos estudios están en consonancia con los resultados presentados en este trabajo y muestran que, aunque la incursión de la PPA en una población libre suele estar caracterizada por altas tasas de mortalidad y sintomatología clínica aguda, en zonas donde la enfermedad tiende a volverse endémica, las tasas de mortalidad disminuyen con el tiempo, dando lugar a un incremento en el número de animales recuperados. Estos animales se caracterizan por presentar altos títulos de anticuerpos y baja o nula viremia por lo que son fácilmente detectados mediante las técnicas de diagnóstico serológico (Costard y *col.*, 2013b; Sanchez-Vizcaino y *col.*, 2012b).

1.2. Caracterización genética.

Los estudios moleculares mediante el análisis del extremo carboxi-terminal del gen *B646L* que codifica para la proteína p72 del vPPA, ha permitido clasificar a todos los aislados del este de Europa en un único genotipo, el genotipo II de la p72, en el que se encuentran los aislados que circulan en el este de África procedentes de Madagascar, Mozambique, Zambia, Malawi, Tanzania y las Islas Mauricio (Rowlands y *col.*, 2008; Malogolovkin y *col.*, 2012; Gallardo y *col.*, 2009c; 2014a). Estos datos sugieren una única entrada del virus en 2007 que, posteriormente, se extendió desde el brote inicial (Gallardo *col.*, 2009a, b).

Mediante el análisis de la región central variable (RCV) dentro del gen *B602L*, utilizada en el subtipado de los aislados del vPPA, todos los virus secuenciados excepto uno, han sido clasificados dentro de la variante GII-RCV1, con un patrón único e idéntico, característico de los aislados que circulan en la región del Cáucaso desde 2007. Este patrón consiste en 10 copias de tetrámeros de aminoácidos del tipo BNDBNDBNAa y también está presente en los aislados de Madagascar, Georgia y Mozambique (Irusta y *col.*, 1996; Nix y *col.*, 2006; Rowlands y *col.*, 2008; Gallardo y *col.*, 2009a, c; 2011a, b,c y 2014a). La excepción encontrada, representante de la variante GII-RCV2, es una muestra de jabalí, recibida en julio de 2015 de la región central de Estonia (Tartu). El amplicon se reveló de un tamaño más pequeño del esperado (~400pb frente a los 500pb de la variante GII-RCV1) al ser analizado en un gel de agarosa al 2%. Esta diferencia quedó confirmada mediante el análisis de la secuencia, que puso de manifiesto una delección de 36 nucleótidos, que al traducirse en aminoácidos, da lugar a una disminución del número de secuencias repetidas en tándem (SRT), pasando de 10 a 7 copias de tetrámeros del tipo BNDBNDBNAa. Esta mutación parece más el resultado de un cambio puntual que la consecuencia del intercambio de genes entre dos cepas, dado que la primera hipótesis es consistente con la situación epidemiológica establecida actualmente en el este de Europa. Para poder analizar con más precisión el origen de la mutación, si esta variante se ha extendido y si a raíz de este cambio pudieran existir dos cepas circulantes, sería necesario hacer un análisis más amplio de muestras recogidas en una región concreta, que abarque el centro-este de Estonia hasta la

frontera con la FR. Este cambio detectado en la secuencia aminoacídica podría llegar a ser muy interesante ya que podría aportar información muy útil a nivel epidemiológico, tanto para realizar un mejor seguimiento de la evolución del virus dentro y fuera de la UE como para determinar el origen de los brotes y por lo tanto la dinámica de la infección.

Los resultados del análisis de las regiones alternativas estudiadas en esta tesis para establecer posibles diferencias entre aislados que, como ya hemos descrito, son genéticamente muy similares (al menos en cuanto a las regiones que abarca el genotipado convencional), mostraron diferencias tanto de tamaño como de secuencia en una de las regiones estudiadas. La región se encuentra situada entre los genes *I73R-I329L* dentro del fragmento Eco RI-I en el extremo derecho del genoma y se caracteriza por la presencia de SRT. Estas regiones con SRT permiten detectar pequeños cambios entre aislados relacionados, y se han descrito como idóneas para estudios de variabilidad ya que permiten establecer relaciones filogenéticas entre ellos, permitiendo así construir mapas epidemiológicos y patrones de diseminación más exactos (Rodríguez y col., 1992; Gallardo, 2003; Nix y col., 2007; Malogolovkin y col., en 2012).

Las diferencias detectadas en dicha región intergénica, radican en la inserción de 10 nucleótidos (GGAATATATA) en la posición nucleotídica 136 del fragmento amplificado. Esta diferencia se detectó en las muestras recibidas de Ucrania, en el año 2012 y se ha mantenido en los aislados bielorrusos recibidos en el año 2013 y en todos los obtenidos a partir de muestras recogidas en los países afectados de la UE en 2014 y 2015 y de Ucrania en 2015. Todos ellos se agrupan, por tanto, dentro de la variante GII-RIG2. Sin embargo, esta inserción no se apreció en ninguno de los aislados secuenciados dentro de esta tesis procedentes de Georgia, Armenia, Azerbaiyán y de la FR, incluidos lo de la región de Tver del año 2012. Todos ellos se agruparon dentro de la variante GII-RIG1 y presentaron un 100% de homología con el primer aislado de Georgia del 2007.

Las diferencias observadas entre los aislados rusos disponibles en el EURL con los aislados de Ucrania, Bielorrusia y la UE, concuerdan con los obtenidos por Malogolovkin y col. en un estudio realizado en 2012, en el que analizaron varias regiones ricas en SRT entre las que se encontraba esta RIG. Ninguna de las muestras reveló la inserción localizada en dicha región. Sin embargo, un estudio reciente realizado en el 2015 por Goller y col., mediante la secuenciación de la RIG de aislados procedentes de los brotes ocurridos entre los años 2012 y 2014 en la FR, describe la presencia de la variante GII-RIG2 en los aislados circulantes en los distritos de Tula o en Smolensk (entre otros) desde el año 2012. Estos datos sugieren que al menos desde el año 2012 las dos variantes genéticas se encuentran co-circulando en determinadas regiones de la FR. La variante GII-RIG2 caracterizada por la presencia de la SRT adicional se habría propagado a través de las fronteras de Bielorrusia y Ucrania, bien a través de las poblaciones de jabalíes, o bien debido a la existencia de comercio activo entre países fronterizos. De Bielorrusia el vPPA se habría propagado a Polonia, Lituania y Letonia y de ahí a Estonia. En este punto, dada la

cercanía, sería muy interesante poder analizar qué está ocurriendo en la frontera de Estonia con la FR en el norte, en la zona de Ida-Viru, fronteriza con el distrito de Leningrado.

1.3. Caracterización biológica.

Así como en las muestras de campo parece que se empiezan a apreciar cambios en el curso de la infección por el vPPA, en las infecciones experimentales realizadas hasta el momento el patrón de evolución es más homogéneo, característico de la PPA aguda causada por virus virulentos.

La infecciones experimentales realizadas entre 2011 y 2015 con aislados del genotipo II por varios grupos de investigación, tanto en jabalíes como en cerdo doméstico, han aportado información muy valiosa en relación a la virulencia, la clínica y la dinámica de la infección que causan los virus circulantes, primero en la zona del Cáucaso y en la FR y, a partir de enero de 2014, también en territorio de la UE (Gabriel y *col.*, 2011, Blome y *col.*, 2012, Guinat y *col.*, 2014; Vlasova y *col.*, 2014; Pietschmann y *col.*, 2015; Gallardo y *col.*, 2015b).

En general, los aislados circulantes en el este de Europa desde 2007 están caracterizados por ser aislados virulentos, que inducen cursos hiperagudos o agudos de la enfermedad, con signos clínicos tales como depresión, reducción en la ingesta, diarrea, fiebre, descoordinación, dificultad al respirar, y, en algunos casos, cianosis. Tras cortos períodos de incubación, de aproximadamente 4 días, tiene lugar la muerte de los animales en menos de 12 días después de la infección.

Las lesiones macroscópicas observadas en todos los animales infectados están directamente relacionadas con procesos hemorrágicos, y entre ellas podemos destacar la aparición de nódulos linfáticos agrandados y hemorrágicos, esplenomegalia, petequias en riñón y pulmón, e hidropericardio. Desde el punto de vista del diagnóstico de laboratorio, el virus es fácilmente detectable por PCR en sangre, incluso antes de la aparición de los síntomas clínicos y en los órganos obtenidos tras la necropsia. Sin embargo, y con alguna excepción, no existe respuesta detectable de anticuerpos mediante ELISA (Gabriel y *col.*, 2011, Blome y *col.*, 2012, Pietschmann y *col.*, 2015; Guinat y *col.*, 2014). En general, la transmisión del virus aparece asociada a la sangre de los animales enfermos, aunque en algún caso también se ha asociado a fómites cuando los animales no estaban en contacto directo pero compartían establo, ventilación y útiles de trabajo (Gabriel, y *col.*, 2011; Pietschmann y *col.*, 2015). En cualquier caso, todos los animales utilizados en estos experimentos, tanto los inoculados (independientemente de la dosis y la ruta de inoculación) como los contacto, murieron o fueron sacrificados por motivos humanitarios a causa de la infección de tipo agudo del vPPA.

Este patrón tiende a reproducirse independientemente de si el animal expuesto es un jabalí o un cerdo doméstico, e independientemente de la edad de éste, aunque de acuerdo con alguna de las experiencias realizadas con jabalíes y cerdos domésticos, parece que en éstos

últimos la transmisión se retarda en comparación con la transmisión a jabalí. Este retraso podría deberse al menor contacto de los cerdos domésticos con la sangre de los jabalíes infectados (Gabriel y *col.*, 2011; Blome y *col.*, 2012, Pietschmann y *col.*, 2015).

Dentro de este patrón agudo o hiperagudo de la PPA, se engloban las experiencias realizadas con los aislados Arm07 (Armenia), Ukr12/Zapo (Ucrania) y LT14/1490 (Lituania), con tasas de mortalidad del 100% en los dos primeros y del 94,5% en el tercero. En todos ellos la inoculación se hizo vía intramuscular con 10 UHAD₅₀/ml de cada uno de los aislados, y en todos se mantuvo un número variable de animales contacto, dos en las experiencias con los aislados Arm07 y Ukr12/Zapo y diez con LT14/1490. En las experiencias con los aislados Arm07 y LT14/1490, los animales mostraron signos clínicos como fiebre, pérdida de peso, debilidad, postración, letargia, descarga ocular, síntomas digestivos, y en algunos casos hemorragias subcutáneas, con distintos grados de severidad. Estos síntomas clínicos aparecieron tras un período de incubación de 4±1 día y los animales murieron o fueron sacrificados también 4±1 días después de la aparición de los signos clínicos. Hay que destacar el hecho de que en la experiencia con el aislado lituano un animal contacto permaneció asintomático durante todo el experimento (61dpi) a pesar de que compartió box con cinco animales que fueron sacrificados debido a la infección por el vPPA. Por el contrario, los animales inoculados con el aislado Ukr12/Zapo presentaron síntomas clínicos variables y murieron en un lapso de tiempo inferior a los 7 días desde la infección (excepto uno, que murió el día 10), incluso en algunos casos sin presentar ninguna sintomatología clínica. A pesar de que la fiebre es uno de los signos más frecuentes en las infecciones por el vPPA, en los cursos hiperagudos de la enfermedad pueden darse casos de animales que mueren de forma súbita sin presentar pirexia u otra sintomatología evidente (Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2014; Pietschmann y *col.*, 2015).

La viremia se detectó en suero o sangre en todos los animales inoculados en el primer o segundo día de toma de muestra, mientras que en los animales contacto se detectó con un retraso de entre 3 y 7 días en la mayoría de los casos, pudiéndose aislar el virus de todos ellos a excepción del animal asintomático, que presentó una viremia débil e intermitente. La respuesta de anticuerpos sólo se observó en un animal contacto en la experiencia con el aislado armenio y en seis de los animales infectados con el aislado lituano.

En las necropsias se observaron lesiones compatibles con la forma aguda de la PPA, como hemorragias internas generalizadas con esplenomegalia y linfadenitis hemorrágica de los ganglios gastro-hepático y, en menor medida y dependiendo del aislado, del renal (Arm07 y Ukr12/Zapo) y sub-mandibular y mesentérico (LT14/1490). También se identificaron petequias en riñón y en pulmón aunque en un menor número de animales. Éste, al igual que el hígado, apareció congestivo en algunos casos. Otras lesiones macroscópicas encontradas en las tres inoculaciones experimentales fueron la presencia de hidropericardio y líquido ascítico. Cabe destacar que el animal asintomático expuesto al aislado de Lituania presentó en la necropsia esplenomegalia hiperémica, petequias en pulmón y hemorragias en los ganglios linfáticos.

En general los tres experimentos realizados mostraron una amplia homogeneidad en cuanto a las características del curso de la enfermedad, signos clínicos, lesiones macroscópicas y viremia y son consistentes con las experiencias realizadas en otros institutos con aislados del Cáucaso y la FR pertenecientes al genotipo II. Las mayores diferencias entre las tres experiencias realizadas aparecen en cuanto al número de animales en los que se detectaron anticuerpos y sobre todo, en el porcentaje de mortalidad del aislado LT14/1490. Mientras que en todos los experimentos, tanto los presentados en este trabajo como los que podemos encontrar en la bibliografía, el porcentaje de mortalidad es del 100%, uno de los animales sobrevivió a la infección por contacto con el aislado lituano. Como hipótesis, se podría pensar que este animal no llegó a contagiarse ya que todos los animales con los que permaneció estabulado fueron sacrificados y no tuvo contacto con la sangre de animales enfermos o moribundos, dado que éste es el mejor vehículo de transmisión del virus. Sin embargo existen varias referencias de experiencias realizadas con aislados recogidos de brotes producidos en el este de Europa desde 2007 en los que se ha demostrado la transmisión del virus por fómites (Gabriel y *col.*, 2011; Blome y *col.*, 2013; Guinat y *col.*, 2014; Pietschmann y *col.*, 2015). Además este animal asintomático presentó picos de viremia, aunque débiles e intermitentes, y en el día de la necropsia mostró lesiones compatibles con la PPA. Por otra parte fue posible detectar el genoma del vPPA en 9 de los 20 órganos analizados, aunque no se consiguió aislar el virus. Todos estos datos sugieren que el animal sí que se infectó y que la ausencia de sintomatología pudo estar relacionada con las características inmunológicas propias del animal.

Respecto a los animales en los que se detectaron anticuerpos, uno con el aislado Arm07 (16,6%), 6 con el aislado LT14/1490 (33%) y ninguno con el aislado Ukr12/Zapo, la diferencia puede ser atribuible en primer lugar a la variabilidad en el número de animales empleados y segundo a la mayor virulencia del aislado ucraniano. Si comparamos el número de animales positivos en alguno de los ELISAs en los experimentos realizados con los aislados armenio y lituano, podemos comprobar que con éste último únicamente fueron 2 (11,1%), dato consistente no sólo con el resultado obtenido con el aislado armenio, sino que está en concordancia con otros datos registrados en la bibliografía en los que aparecen animales con resultados positivos a anticuerpos por ELISA (Guinat y *col.*, en 2014; Mur y *col.*, 2014b). Por otra parte, en la experiencia realizada por Pietschmann y *col.* en 2015 tres animales que murieron en el octavo día de infección, dieron resultados no concluyentes (reactividad débil con elevado fondo) en IPT pero negativos en ELISA.

De los resultados obtenidos podríamos aventurar que algunos animales viven el tiempo suficiente para empezar a desarrollar anticuerpos aunque sólo en algunos casos el suficiente para que sean detectables por ELISA. Las diferencias encontradas con las experiencias realizadas en otros institutos pueden ser debidas a las técnicas con las que se analizan, ya que no en todos emplearon la IPT, más sensible en la detección de anticuerpos principalmente a tiempos tempranos de infección, demostrando una vez más la importancia que tiene el uso de

técnicas sensibles y específicas también a la hora de determinar la dinámica de infección (Gallardo y col., 2015a).

Cabe destacar la importancia del experimento “*in vivo*” con el aislado LT14/1490 y su comparativa con la dinámica de infección del foco declarado el 24 de julio de 2014 en una explotación de producción intensiva, con un buen nivel de bioseguridad, situada en el distrito de Ignalina (Lituania), en el que casi 20.000 animales tuvieron que ser sacrificados (CE, DG-SANTE 2014). La dinámica de la infección observada en la explotación corroboró en el campo lo que se había visto con anterioridad en el laboratorio, ya que se estableció una pauta de infección similar a la observada en la experiencia “*in vivo*” realizada con el aislado lituano LT14/1490. Esta pauta consistió en la muerte repentina de un reducido número de animales alojados en el mismo establo. En un primer momento se atribuyó a una intoxicación alimentaria, pero siguió una segunda fase epizootica pocos días después, que originó una mortalidad más significativa. Finalmente, a los pocos días, se produjo la muerte masiva de los animales alojados en la nave. El proceso parece coincidir con la inoculación y posterior infección de los animales contacto a los 12-14 días establecido en este experimento.

En este caso, desde la entrada del virus hasta su detección transcurrieron varias semanas, tiempo que pudo haberse acortado si se hubieran puesto en marcha mecanismos de alerta, dado el alto riesgo que existía en la región por la proximidad de la frontera con Bielorrusia, con una observación clínica más exhaustiva de los animales, no restando importancia a la aparición de muertes repentinas y sobre todo, con un diagnóstico laboratorial tras las primeras muertes. Este ejemplo pone de manifiesto la necesidad de sospechar de un posible caso de PPA, siempre que las circunstancias epidemiológicas la hagan posible, y confirmar o descartar su presencia mediante el envío de muestras de los animales muertos al laboratorio.

2. Evaluación de técnicas de diagnóstico para la detección de la enfermedad en el este de Europa.

Ya hemos visto cómo se comporta el vPPA en los animales infectados y cómo se desarrolla la infección que induce. Pero no podemos olvidar que el fin último es erradicar la PPA, para lo que la detección en el laboratorio, en ausencia de vacuna, es crucial para poner en marcha los planes de contingencia y controlar su expansión.

Para un buen diagnóstico laboratorial es básico contar con buenas técnicas de análisis, que presenten porcentajes de sensibilidad y especificidad adecuados y que sean fiables y fáciles de interpretar. Por lo tanto es conveniente determinar qué técnicas son las más adecuadas para poder establecer de forma fidedigna si un animal es positivo o no a PPA. Para ello es imprescindible hacer hincapié en que un diagnóstico adecuado implica la detección de la partícula viral, sus antígenos o genoma y de los anticuerpos específicos frente al virus, ya que se

requiere la identificación de todos los animales que están o han sido infectados con el virus (OIE, 2015b; Oura y *col.*, 2013; Sánchez-Vizcaíno y *col.*, 2013a).

Actualmente, las pruebas recomendadas por la OIE para la detección del virus incluyen la detección del propio agente mediante aislamiento en cultivo primario, antígenos virales mediante anticuerpos fluorescentes (IFD) o del genoma viral mediante PCR. De todas las PCRs disponibles, en el Manual de la OIE figuran dos: la PCR convencional desarrollada por Agüero y *col.* en 2003 y la PCR en tiempo real desarrollada por King y *col.*, también en 2003. Dentro de los test para la detección de anticuerpos encontramos el ELISA indirecto, como prueba de cribado y el Immunoblotting (IB) e inmunofluorescencia indirecta (IFI) como pruebas de confirmación (OIE, 2015b).

Además, existen otras técnicas disponibles tanto para la detección del virus como para la detección de anticuerpos específicos. Entre las primeras se encuentran la UPL-PCR desarrollada y validada recientemente, capaz de proporcionar una mayor sensibilidad en la detección de animales que han sobrevivido a la infección y el ELISA de antígeno, que aunque presenta una sensibilidad limitada, permite el análisis de un gran número de muestras (Fernandez-Pinero y *col.*, 2013; Oura y *col.*, 2013). Entre las técnicas serológicas encontramos la IPT, con una elevada sensibilidad analítica que, junto con el gran número de muestras que admite y su bajo coste, permite que sea utilizada como test de confirmación para la detección de anticuerpos frente al vPPA (Gallardo y *col.*, 2012a) y tres ELISAs comerciales: ®Ingezim PPA COMPAC 11.PPA.K3 (Ingenasa, Madrid, España); ID Screen ®African swine fever Indirect ELISA kit (IdVet, Grabels, Francia) y Svanovir ® ASFV-Ab ELISA (Svanova, Uppsala Suecia).

En este trabajo, todas estas técnicas se compararon mediante el análisis de muestras de campo y muestras experimentales de animales infectados con diferentes aislados del genotipo II, todos ellos circulantes en el este de Europa. El objetivo fundamental era evaluar la capacidad real de detección y su adecuación a la situación epidemiológica actual. Ya existían, no obstante, estudios comparativos previos, tanto serológicos como virológicos, basados fundamentalmente en muestras recibidas del continente africano (Gallardo y *col.*, 2013; Oura y *col.*, 2013).

Mediante las técnicas de PCR convencional y en tiempo real prescritas por la OIE (OIE 2014; Agüero y *col.*, 2003; King y *col.*, 2003) y la técnica de UPL-PCR descrita por Fernández-Pinero y *col.* en 2013, se analizaron en paralelo un total de 785 muestras de campo y experimentales obtenidas a partir de animales infectados con vPPA del genotipo II. Los resultados mostraron que un 3,3% más de muestras resultaron positivas mediante la UPL-PCR en comparación con la PCR convencional de la OIE. Ambas PCRs fueron capaces de detectar el genoma del vPPA en presencia de altos niveles de virus en sangre y tejidos, coincidentes con la fase clínica de la infección. Sin embargo, la PCR convencional de la OIE no fue capaz de detectar muestras con valores de Ct por encima de 30, presentes en muestras recogidas durante las primeras etapas

de la infección. Esta menor sensibilidad podría ser debida a la presencia de una mutación identificada cerca del extremo 3' en el cebador de ida, en la secuencia diana de los aislados del genotipo II de Georgia 2007 (nº acceso GenBank FR682468), Krasnodar 2012 (nº acceso GenBank KJ195685), Lituania y Polonia 2014 (Fernandez-Pinero 2014, comunicación personal).

Comparando los resultados obtenidos mediante la UPL-PCR y los de la PCR en tiempo real de la OIE, se detectó una mínima diferencia ($p = 0,015$) en el número total de muestras positivas. La UPL-PCR fue capaz de detectar el genoma viral en 797 de las 895 analizadas, mientras que el número de positivos obtenido con la PCR en tiempo real de la OIE fue de 785. Con la técnica prescrita por la OIE se obtuvo un resultado negativo en 12 muestras previamente clasificadas como positivas débiles ($Ct > 35$) mediante la UPL-PCR. A pesar de que el virus no pudo ser aislado de estas muestras, la especificidad de los resultados obtenidos con la UPL-PCR quedó demostrada por el resultado positivo a anticuerpos obtenido en 3 muestras de campo procedentes de jabalíes, lo que indicaba la exposición previa de los animales al vPPA y porque 9 de las 12 muestras provenían del animal que permaneció asintomático en la experiencia con el aislado lituano LT14/1490, que también estuvo expuesto al virus (Gallardo y *col.*, 2015b). Estos resultados confirman lo descrito previamente por Fernández-Pinero y *col.*, en 2013 demostrando la mayor sensibilidad diagnóstica de la técnica de UPL-PCR, especialmente en la detección temprana de la infección y en la detección de animales que han sobrevivido a la misma.

Los resultados obtenidos mediante el análisis en paralelo de 277 muestras utilizando las tres PCRs y el ELISA de antígeno (Ingezim PPA DAS 11.PPA.K2, Ingenasa, Madrid, España), confirmaron la falta de sensibilidad (77,2%) de esta técnica al compararla con las PCRs, especialmente con la UPL-PCR. Esta falta de sensibilidad se hizo más patente al analizar las muestras de campo, probablemente debido a las malas condiciones de las muestras recibidas, lo que afecta a su sensibilidad, como ya se ha descrito con anterioridad (Oura y *col.*, 2013). Es importante tener en cuenta también, en relación a la falta de sensibilidad, que la formación de los complejos antígeno-anticuerpo en los tejidos de animales seropositivos, puede impedir la unión entre el antígeno del vPPA y el conjugado dando lugar a la aparición de falsos negativos. En cualquier caso, y considerando los altos títulos de virus que presentan los animales infectados con aislados virulentos, la técnica de ELISA de antígeno debería ser capaz de detectar la infección en un brote agudo de la enfermedad (Gabriel y *col.*, 2011; Blome y *col.*, 2012, 2013; Gallardo y *col.*, 2014b; Guinat y *col.*, 2014). No obstante, a pesar de ello y de la comodidad que implica su uso debido al bajo coste, rapidez y al hecho de que permite analizar un elevado número de muestras, el uso del ELISA de antígeno sólo se recomienda como una prueba de "grupo" y debe ir siempre acompañada de otras pruebas virológicas y/o serológicas.

En relación al aislamiento viral se obtuvieron resultados variables relacionados con el origen de las muestras. En muestras positivas en PCR procedentes de las infecciones experimentales

se pudo aislar el vPPA con relativa facilidad, siempre que los Ct estuvieran comprendidos en un rango de $36 \pm 3,5$. Sin embargo, a partir de las muestras de campo, y a pesar de presentar alto contenido genómico, fue más difícil aislar el virus, hecho especialmente significativo en el caso de las muestras de jabalí en donde sólo se consiguió aislamiento positivo en 27 de los 91 animales analizados. Esto podría estar relacionado con el mal estado de las muestras, que puede afectar a la viabilidad del virus, máxime si tenemos en cuenta el elevado porcentaje de muestras analizadas procedentes de jabalíes muertos o cazados que suponen el 73% del total de animales analizados con esta técnica. En cualquier caso, a pesar de que el aislamiento viral es una técnica más laboriosa y costosa que las anteriores y requiere instalaciones especiales de bioseguridad, es la técnica recomendada por la OIE (OIE, 2015b) para la confirmación de focos primarios y además es esencial para conseguir stock suficiente de virus para estudios posteriores de caracterización molecular y/o biológica.

Las técnicas serológicas son especialmente relevantes en el diagnóstico de la PPA puesto que la presencia de anticuerpos indica siempre, al no existir vacuna, un contacto previo con el virus y además porque los anticuerpos aparecen a tiempos tempranos y se mantienen durante meses, siendo por lo tanto buenos marcadores de infección. Respecto a las técnicas de diagnóstico serológico evaluadas, los resultados obtenidos en el análisis de muestras de suero mostraron una mayor sensibilidad de la IPT respecto a los cuatro ELISAS incluidos en el estudio comparativo, ya que fue capaz de detectar anticuerpos en etapas más tempranas de la infección (Gallardo y *col.*, 2014b). Utilizando como técnica de referencia la IPT (Gallardo y *col.*, 2012a, 2013), se determinó la sensibilidad de los ELISAs utilizados. El ELISA de Ingenasa detectó la mitad de los sueros clasificados como positivos por la IPT, mientras que el ELISA de la OIE únicamente detectó el 22,2%. La baja sensibilidad del ELISA de la OIE puede ser debido a que las muestras se obtuvieron en su totalidad de animales que presentaban cursos agudos de infección por lo que fueron obtenidas a tiempos tempranos cuando el título de anticuerpos es todavía muy bajo (Gallardo y *col.*, 2012a; 2014b, Mur y *col.*, 2014b).

De acuerdo con los resultados obtenidos y de cara a establecer una correcta metodología para el diagnóstico de la PPA, podemos considerar dos estrategias diferentes en función del objetivo que se quiere alcanzar. Por un lado el diagnóstico de la PPA requiere rapidez y el análisis de un elevado número de muestras de forma automatizada. Es por ello que la técnica de ELISA y aún con sus limitaciones debido a la falta de sensibilidad en la detección temprana de la infección, es la técnica de elección por su sencillez, bajo coste y por no requerir equipamiento ni instalaciones especializadas. Es importante considerar que en el diagnóstico de la PPA, hay que incluir tanto la detección de los anticuerpos específicos frente al vPPA como del propio agente biológico, por lo que si un animal está infectado por el vPPA y la respuesta de anticuerpos está comenzando, la enfermedad se detectará fácilmente por las técnicas virológicas.

Por otra parte si queremos estudiar tasas de seroprevalencia y dinámica de la infección, sobre todo en infecciones agudas provocadas por aislados virulentos, la IPT podría plantearse como la mejor opción, puesto que si utilizamos el ELISA los valores de seroprevalencia estarían subestimados. Sin embargo, hay que tener en cuenta que la IPT requiere el examen individualizado al microscopio de cada una de las muestras y que existe un grado de subjetividad, ya que la interpretación puede variar en función de la persona que realice el análisis.

Como se ha podido observar a lo largo del presente trabajo, el papel del jabalí ha sido muy relevante en la propagación de la PPA desde los países del Cáucaso hasta llegar a la UE y, sobre todo, dentro de la propia UE con multitud de casos en jabalí en los países afectados (OIE, informe de situación 2015). Este hecho supone un serio desafío por la necesidad urgente de aplicar medidas efectivas de vigilancia y control y la dificultad que entraña la falta de datos exactos relativos a las poblaciones de jabalíes. También para los laboratorios de diagnóstico está suponiendo un reto ya que el tipo de muestra recibida no siempre es la óptima para el análisis (de la Torre y *col.*, 2013; Mur y *col.*, 2014c). De hecho, en muchas ocasiones, las muestras se recogen de animales muertos, por lo que el abanico de muestras disponible no es muy amplio y la muestra que se remite al laboratorio no es, en la mayoría de los casos, la más apropiada.

Por ello resulta muy importante conocer la fiabilidad y adecuación de cada una de las técnicas disponibles en el análisis de muestras alternativas. Mediante la técnica de PCR se ha demostrado que se puede detectar el ADN incluso en muestras en estado de putrefacción o en muestras poco frecuentes, como la médula ósea. Sin embargo, con la serología se plantea un problema. Por una parte la detección de anticuerpos es esencial para determinar la fecha de la infección y obtener así una imagen completa de la epidemiología de la enfermedad en una región, pero por otra, las muestras disponibles para obtener esa información se encuentran muchas veces en mal estado o están muy hemolizadas (o son realmente sangre), lo que provoca la aparición de falsos negativos en el ELISA de la OIE y de falsos positivos en el ELISA más empleado a nivel europeo, el ELISA de Ingenasa.

Para evaluar el rendimiento de las técnicas disponibles en la detección de anticuerpos frente al vPPA en las nuevas muestras recibidas de jabalíes, se analizaron exudados de tejidos de animales tanto infectados como libres de PPA. La primera evaluación mediante el análisis de muestras de exudados obtenidas de infecciones experimentales, mostró el ELISA de Ingenasa como el más sensible, puesto que detectó anticuerpos en el 60% de los cerdos infectados. Utilizando la IPT el porcentaje disminuyó al 30% y a menos del 20% al utilizar los tres ELISAs restantes, el ELISA de la OIE, de IdVet y el de SVANOVA. Sin embargo, al analizar los exudados de los animales libres de PPA, únicamente con la IPT y el ELISA de IdVet se obtuvo una especificidad del 100%, mientras que con el ELISA de Ingenasa la especificidad fue del 84,3%. Esta baja especificidad puede ser debida al uso de muestras hemolizadas obtenidas a partir de

tejidos, lo que coincide con estudios previos que afirman que sueros muy hemolizados pueden influir en el rendimiento de este ELISA y, además, el fabricante no recomienda su uso en este tipo de muestra (Gallardo y *col.*, 2014b). Asimismo, los resultados obtenidos ponen de relieve el hecho de que los resultados positivos de ELISA siempre deben ser confirmados por métodos alternativos, como IPT, IFI o IB, tal y como está recomendado en el Manual de diagnóstico de la OIE (OIE, 2015b). Por otra parte y aunque ya se comprobó la validez de la IPT para la detección de anticuerpos específicos frente al vPPA en este tipo de muestras alternativas (Gallardo y *col.*, 2012a), los resultados obtenidos tras el análisis de más de 500 muestras, han demostrado su excelente rendimiento en muestras sobre las que, de otra forma, no se podría realizar un análisis serológico fiable como son los exudados o la sangre.

Para determinar la fecha de inicio de la infección en función de la presencia o no de anticuerpos específicos y de su título, las muestras de jabalí y cerdo doméstico se analizaron con la IPT. Como resultado global se obtuvo un mayor porcentaje de jabalíes positivos a anticuerpos con títulos en general más altos que los observados en cerdo doméstico, lo que se explica por las rápidas medidas de control establecidas en las explotaciones de producción porcina.

En conclusión y a raíz del estudio comparativo realizado, podemos afirmar que la UPL-PCR en combinación con la IPT, ofrecen los resultados más fiables y constituyen los métodos más idóneos para una detección precoz de la PPA en los países de la UE afectados. La PCR en tiempo real de la OIE también ofrece resultados muy fiables ya que presenta unos niveles de concordancia excelentes con la UPL-PCR. Por otra parte, y en función de los resultados obtenidos en el estudio comparativo de las técnicas serológicas, es necesario el desarrollo y/o la mejora de las técnicas de ELISA que nos permitan una mayor sensibilidad en la detección de la infección temprana, obteniendo así una información más completa de la dinámica de la infección que ayude en los programas de control y erradicación. Teniendo en cuenta la situación actual y los resultados de este trabajo, la IPT se perfila como la técnica de elección en muestras de sangre, suero y exudado de tejido de jabalí, así como en muestras de cerdo doméstico cuando éstos aparecen muertos o enfermos, ya que su elevada sensibilidad proporciona una ventaja a la hora de obtener la información relativa a los tiempos de infección, y por consiguiente contribuir a dibujar un mapa de la evolución de la enfermedad más preciso en las zonas afectadas.

La situación epidemiológica actual en el este de Europa es seria y muy preocupante. Existe una falta de un control eficaz en la FR y otros países vecinos fronterizos como Ucrania y Bielorrusia y apenas se dispone de información en las regiones del Cáucaso. Por otro lado, los resultados de este estudio en el análisis de muestras de campo, demuestran que, lejos de remitir, la PPA continua su expansión y se están detectando jabalíes en las tres repúblicas bálticas que están sobreviviendo más de un mes a la infección, lo que parece indicar una evolución del virus a formas menos virulentas y/o una adaptación del jabalí a la infección por

el vPPA. Los sistemas de control no están funcionando y la PPA se está estableciendo dentro de las fronteras de la UE, al igual que ya lo ha hecho en la FR y, probablemente, en Bielorrusia y Ucrania y en los países del Cáucaso, donde la información es muy escasa o nula.

La búsqueda de una vacuna eficaz y segura frente a la PPA es ahora más necesaria que nunca, pero los datos actuales indican que aún tardará años en llegar. Las herramientas para su control y erradicación pasan por una detección precoz en campo y un diagnóstico rápido de laboratorio, unido a fuertes y estrictas medidas sanitarias. Estas deberían fomentar las campañas de información y concienciación de todos los sectores implicados servicios veterinarios, productores, ganaderos veterinarios y cazadores, una medida que actualmente no está dando los resultados esperados. Entre otras medidas sanitarias, la UE ya está aplicando un mayor control en fronteras, la desinfección de vehículos de ganado, suspensión de mercados de ganado, mayor bioseguridad en las granjas, programas de vigilancia reforzados que incluyen un aumento de los análisis diagnósticos para un mejor control de cerdos domésticos y jabalíes, la creación de zonas de contención para reducir la densidad de jabalíes y limitar sus movimientos a través de fronteras y en algunos casos, sacrificios preventivos de cerdos en las granjas de traspaso situadas en zonas de riesgo.

Todavía existen importantes lagunas y falta de información sobre la epidemiología de la PPA en el este de Europa, sobre sus mecanismos de transmisión, la persistencia del virus en el hospedador o la interacción virus-huésped. Avanzar en el conocimiento de estos temas, en la resolución de problemas y promover los estudios de investigación epidemiológica que sean necesarios en las zonas afectadas son algunos temas en los que necesitamos seguir trabajando. No obstante, mientras los países fronterizos a la UE no contengan la enfermedad, debemos ser conscientes de que se seguirán produciendo casos esporádicos dentro de las fronteras de la Unión que habrá que combatir. El panorama actual nos muestra que, no podremos olvidarnos de la PPA en mucho tiempo y por ello, todos los países debemos estar preparados.

CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos mediante el análisis de 350 animales procedentes de los países afectados del este de Europa, representativas del 18% de los focos y casos de la UE, revelaron la presencia de anticuerpos en el 50,9% de los animales analizados. De ellos, un 53,3% correspondió a jabalíes y un 42,3% a cerdo doméstico.
2. El 27% de los jabalíes seropositivos, todos ellos procedentes de los casos ocurridos en el año 2015, resultaron negativos (o en el límite de detección) mediante la UPL-PCR, lo que representa el 14% del total de jabalíes analizados. Estos resultados indican que se está produciendo una evolución en la dinámica de la infección con un incremento en el número de animales supervivientes, que se caracterizan por presentar altos títulos de anticuerpos y baja o nula viremia.
3. Todos los aislados del este de Europa se clasifican dentro del genotipo II de la p72. Estos datos sugieren una única entrada del virus en Georgia en el 2007.
4. Mediante el análisis de la región central variable (RCV), se ha identificado una nueva variante del vPPA caracterizada por la delección de 12 aminoácidos asociada al caso de un jabalí que tuvo lugar en julio del 2015 en la región central de Estonia.
5. El análisis de regiones alternativas del genoma del vPPA nos ha permitido identificar un nuevo marcador genético, la región intergénica entre los genes *I73R-I329L*, que clasifica los aislados circulando en el este de Europa en dos variantes genéticas. La variante GII-RIG2, presente en los virus de Ucrania y Bielorrusia secuenciados en esta tesis, es la responsable de los brotes en los países de la UE desde el 2014.
6. Los estudios de caracterización biológica con aislados del vPPA del genotipo II han demostrado que son aislados virulentos que inducen un patrón de infección típicamente agudo o hiperagudo con una mortalidad de entre el 94,5% y el 100%.
7. Los resultados obtenidos en el estudio de evaluación de las técnicas de diagnóstico de la PPA mediante el análisis de 1274 muestras de campo y experimentales, han puesto de manifiesto que la UPL-PCR en combinación con la IPT, ofrecen los resultados más fiables para una detección temprana de la PPA en los países afectados de la UE.
8. En ausencia de suero, el análisis por IPT de muestras alternativas como sangre o exudado de tejidos, resulta de gran utilidad para establecer la dinámica de la infección en función de la presencia o no de anticuerpos específicos frente al virus. Esto es especialmente relevante en el diagnóstico en jabalíes debido al elevado número de casos en los países de la UE.

BIBLIOGRAFÍA

- Abrams CC, Goatley L, Fishbourne E, Chapman D, Cooke L, Oura CA, Netherton CL, Takamatsu HH, Dixon LK (2013): "Deletion of virulence associated genes from attenuated African swine fever virus isolate OUR T88/3 decreases its ability to protect against challenge with virulent virus". *Virology*; 443(1):99-105.
- Adkin A, Coburn H, England T, Hall S, Harnett E, Marooney C, Wooldridge M, Watson E, Cooper J, Cox T, Seaman M (2004): "Risk assessment for the illegal import of contaminated meat and meat products into Great Britain and the subsequent exposure of GB livestock (IIRA): foot and mouth disease (FMD), classical swine fever (CSF) African swine fever (ASF), swine vesicular disease (SVD)". *Veterinary Laboratories Agency*, New Haw.
- Agüero M, Blasco R, Wilkinson P, Vinuela E (1990): "Analysis of naturally-occurring deletion variants of African swine fever virus—multigene family-110 is not essential for infectivity or virulence in pigs". *Virology*; 176: 195–204.
- Agüero M, Fernández J, Romero L, Sánchez Mascaraque C, Arias M, Sánchez-Vizcaíno, JM (2003): "Highly sensitive PCR assay for routine diagnosis of African swine fever virus in clinical samples". *J Clin Microbiol*; 41: 4431–4434.
- Agüero M, Fernández J, Romero LJ, Zamora MJ, Sánchez C, Belák S, Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM (2004): "A highly sensitive and specific gel-based multiplex RT-PCR assay for the simultaneous and differential diagnosis of African swine fever and Classical swine fever in clinical samples". *Vet Res*; 35(5):551-63.
- Alcamí A, Carrascosa AL, Viñuela E (1989): "The entry of African swine fever virus into Vero cells". *Virology*; 171(1):68-75.
- Alcamí A, Carrascosa AL, Viñuela E (1990): "Interaction of African swine fever virus with macrophages". *Virus Res*; 17(2):93-104.
- Alcamí A, Angulo A, López-Otín C, Muñoz M, Freije JM, Carrascosa AL, Viñuela E (1992): "Amino acid sequence and structural properties of protein p12, an African swine fever virus attachment protein". *J Virol*; 66(6):3860-8.
- Alcaraz C, Pasamontes B, Ruiz-Gonzalvo F, Escribano JM (1989): "African swine fever virus-induced proteins on the plasma membranes of infected cells". *Virology*; 168(2):406-8.
- Alcaraz C, De Diego M, Pastor MJ, Escribano JM (1990): "Comparison of a radioimmunoprecipitation assay to immunoblotting and ELISA for detection of antibody to African swine fever virus". *J Vet Diagn Invest*; 2: 191–196.
- Alcaraz C, Brun A, Ruiz-Gonzalvo F, Escribano JM (1992): "Cell culture propagation modifies the African swine fever virus replication phenotype in macrophages and generates viral subpopulations differing in protein p54". *Virus Res*; 23: 173–182.

- Alcaraz C, Rodríguez F, Oviedo JM, Eiras A, De Diego M, Alonso C, Escribano JM (1995): "Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54". *J Virol Methods*; 52 (1-2):111-9.
- Almazan F, Murguía JR, Rodríguez JM, De la Vega I, Viñuela E (1995): "A set of African swine fever virus tandem repeats shares similarities with Sar-like sequences". *J Gen Virol*; 76: 729–740.
- Almendral JM, Blasco R, Ley V, Beloso A, Talavera A, Viñuela E (1984): "Restriction site map of African swine fever virus DNA". *Virology*; 133(2):258-70.
- Almendral JM, Almazán F, Blasco R, Viñuela E (1990): "Multigene families in African swine fever virus: family 110". *J Virol*; 64(5):2064-72.
- Anderson EC, Hutchings GH, Mukarati N, Wilkinson PJ (1998): "African swine fever virus infection of the bushpig (*Potamochoerus porcus*) and its significance in the epidemiology of the disease". *Veterinary Microbiology*; 62: 1-15.
- Argilaguuet JM, Pérez-Martín E, Gallardo C, Salguero FJ, Borrego B, Lacasta A, Accensi F, Díaz I, Nofrarías M, Pujols M, Blanco E, Pérez-Filgueira M, Escribano JM, Rodríguez F (2011): "Enhancing DNA immunization by targeting ASFV antigens to SLA-II bearing cells". *Vaccine*; 29: 5379–5385.
- Argilaguuet JM, Pérez-Martín E, Nofrarías M, Gallardo C, Accensi F, Lacasta A, Mora M, Ballester M, Galindo-Cardiel I, López-Soria S, Escribano JM, Reche PA, Rodríguez F (2012): "DNA vaccination partially protects against African swine fever virus lethal challenge in the absence of antibodies ". *PLoS One*; 7(9):e40942. doi: 10.1371/journal.pone.0040942.
- Argilaguuet JM, Pérez-Martín E, López S, Goethe M, Escribano JM, Giesow K, Keil GM, Rodríguez F (2013): "BacMam immunization partially protects pigs against sublethal challenge with African swine fever virus". *Antiviral Res*; 98(1):61-5.
- Arias M, Escribano JM, Sánchez-Vizcaíno JM (1993): "Persistence of African swine fever antibody reactivity on ELISA and immunoblotting assays". *Vet Rec*; 133: 189-190.
- Arias M, Sánchez-Vizcaíno JM (2002): "African swine fever eradication: the Spanish model". In: *Trends in Emerging Viral Infections of Swine*. Morilla A, Jin K, Zimmerman J (Eds.). Iowa State University Press, Iowa, United States of America, pp. 133–139.
- Arzuza O, Urzainqui A, Díaz-Ruiz JR, Tabarés E (1992): "Morphogenesis of African swine fever virus in monkey kidney cells after reversible inhibition of replication by cycloheximide". *Arch Virol*; 124(3-4):343-54.
- ATCC® ANIMAL CELL CULTURE GUIDE: tips and techniques for continuous cell lines. Disponible en: http://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/AnimCellCulture_Guide.ashx.

- Ballester M, Rodríguez-Cariño C, Pérez M, Gallardo C, Rodríguez JM, Salas ML, Rodríguez F (2011): "Disruption of nuclear organization during the initial phase of African swine fever virus infection". *J Virol*; 85(16):8263-9.
- Balyshev VM, Kurinnov VV, Tsybanov SG, Kalantaenko YF, Kolbasov DV, Pronin VV, Korneva GV (2010): "Biological properties of African swine fever virus isolated in the Russian Federation". *Veterinary*; 7: 25–27.
- Barderas MG, Rodríguez F, Gómez-Puertas P, Avilés M, Beitia F, Alonso C, Escribano JM (2001): "Antigenic and immunogenic properties of a chimera of two immunodominant African swine fever virus proteins". *Arch Virol*; 146: 1681–1691.
- Basto AP, Portugal RS, Nix RJ, Cartaxeiro C, Boinas F, Dixon LK, Leitao A, Martins C (2006): "Development of a nested PCR and its internal control for the detection of African swine fever virus (ASFV) in *Ornithodoros erraticus*". *Arch Virol*; 151: 819–826.
- Bastos AD, Penrith ML, Crucièrè C, Edrich JL, Hutchings G, Roger F, Couacy-Hymann E, Thomson RG (2003): "Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterization". *Arch Virol*; 148(4):693-706.
- Bastos AD, Penrith ML, Macome F, Pinto F, Thomson GR (2004): "Co-circulation of two genetically distinct viruses in an outbreak of African swine fever in Mozambique: no evidence for individual co-infection". *Vet Microbiol*; 103(3-4):169-82.
- Bastos AD, Arnot LF, Jacquier MD, Maree S (2009): "A host species-informative internal control for molecular assessment of African swine fever virus infection rates in the African sylvatic cycle *Ornithodoros* vector". *Med Vet Entomol*; 23(4):399-409.
- Beltrán-Alcrudo D, Lubroth J, Depner K, De la Roque S (2008): "African swine fever in the Caucasus". *FAO EMPRES Watch*; 1-8.
- Beltrán-Alcrudo D, Guberti V, de Simone L, de Castro J, Rozstalnyy A, Dietze K, Wainwright S, Slingerbergh J (2009): "African Swine Fever Spread in the Russian Federation and the Risk for the Region". *EMPRES watch*, FAO, Rome.
- Belyanin SA, Vasilev AP, Kolbasov DV, Tsybanov SZh, Balyshev VM, Kurinnov VV, Chernykh OYu (2011): "Virulence of African swine fever isolates". *Veterinary of Cuban*; 5:9-11.
- Bishop RP, Fleischauer C, de Villiers EP, Okoth EA, Arias M, Gallardo C, Upton C (2015): "Comparative analysis of the complete genome sequences of Kenyan African swine fever virus isolates within p72 genotypes IX and X". *Virus Genes*; 50(2):303-9.
- Blasco R, De la Vega I, Almazan F, Aguero M, Vinuela E (1989): "Genetic-variation of African swine fever virus – variable regions near the ends of the viral-DNA". *Virology* 173: 251–257.

- Blome S, Gabriel C, Dietze K, Breithaupt A, Beer M (2012): "High virulence of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars of all ages". *Emerg Infect Dis*; 18(4):708.
- Blome S, Gabriel C, Beer M (2013): "Pathogenesis of African swine fever in domestic pigs and European wild boar". *Virus Res*; 173(1):122-30.
- Blome S, Goller KV, Petrov A, Dräger C, Pietschmann J, Beer M (2014): "Alternative sampling strategies for passive classical and African swine fever surveillance in wild boar--extension towards African swine fever virus antibody detection". *Vet Microbiol*; 174(3-4):607-8.
- Boadella M, Gortázar C, Acevedo P, Carta T, Martin-Hernando MP, de la Fuente J, Vicente J (2011): "Six recommendations for improving monitoring of diseases shared with wildlife: examples regarding mycobacterial infections in Spain". *Eur J Wildl Res*; 57: 697–706.
- Boinas FS, Hutchings GH, Dixon LK, Wilkinson PJ (2004): "Characterization of pathogenic and non-pathogenic African swine fever virus isolates from *Ornithodoros erraticus* inhabiting pig premises in Portugal". *J Gen Virol*; 85: 2177–2187.
- Boinas FS, Wilson AJ, Hutchings GH, Martins C, Dixon LK, (2011): "The persistence of African swine fever virus in field-infected *Ornithodoros erraticus* during the ASF endemic period in Portugal". *PLoS One*; 6:e20383. doi:10.1371/journal.pone.002038.
- Bool PH, Ordas A, Sánchez-Botija C (1969): "Diagnóstico de la Peste Porcina Africana por inmunofluorescencia". *Bull Off Int Epiz*; 72: 819-839.
- Boshoff CI, Bastos AD, Gerber LJ, Vosloo W (2007): "Genetic characterisation of African swine fever viruses from outbreaks in southern Africa (1973-1999)". *Veterinary Microbiology*; 121: 45-55.
- Breese S, De Boer CJ (1966): "Electron microscope observation of African Swine fever virus in tissue culture cells. *Virology*; 28: 420-428.
- Breese SS Jr, Stone SS, DeBoer CJ, Hess WR (1967): "Electron microscopy of the interaction of African swine fever virus with ferritin-conjugated antibody". *Virology*; 31(3):508-13.
- Brookes SM, Hyatt AD, Wise T, Parkhouse RM (1998): "Intracellular virus DNA distribution and the acquisition of the nucleoprotein core during African swine fever virus particle assembly: ultrastructural in situ hybridisation and DNase-gold labelling". *Virology*; 249(1):175-88.
- Brun A, Rivas C, Esteban M, Escribano JM, Alonso C (1996): "African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death ". *Virology*; 225(1):227-30.
- Caiado JM, Boinas FS, Louza AC (1988): "Epidemiological research of African swine fever (ASF) in Portugal: the role of vectors and virus reservoirs". *Acta Vet Scand Suppl*; 84:136-8.

- Camacho A, Viñuela E (1991): "Protein p22 of African swine fever virus: an early structural protein that is incorporated into the membrane of infected cells". *Virology*; 181(1):251-7.
- Canals A, Alonso F, Tomillo J, Domínguez J (1992): "Analysis of T lymphocyte subsets proliferating in response to infective and UV-inactivated African swine fever viruses". *Vet Microbiol*; 33(1-4):117-27.
- Cañón J, Dunner S, Sevane N, Cortés O, Gallardo C, Arias M, Sánchez-Vizacino JM (2015): "Caracterización genética mediante un chip de ADN de media densidad en poblaciones porcinas tolerantes frente a la infección con nuevas variantes del virus de la Peste porcina africana". *Actas Iberoamericanas de Conservación Animal (AICA)*, en prensa.
- Carnero R, Larenaudie B, Ruiz-Gonzalvo F, Haag J (1967): "Peste porcine africaine. Etudes sur la reaction d'hemadsorption et son inhibition par des anticorps specifiques". *Rec Vet Med*; 143: 49-59.
- Carrasco L, de Lara FC, Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Villeda CJ, Wilkinson PJ, Sierra MA (1996a): "The pathogenic role of pulmonary intravascular macrophages in acute African swine fever". *Research in Veterinary Science*; 61: 193-198.
- Carrasco L, de Lara FC, Martín de las Mulas J, Gómez-Villamandos JC, Hervas J, Wilkinson PJ, Sierra MA (1996b). "Virus association with lymphocytes in acute African swine fever". *Vet Res*; 27(3):305-12.
- Carrasco L, de Lara FC, Martín de las Mulas J, Gómez-Villamandos JC, Perez J, Wilkinson PJ, Sierra MA (1996c): "Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever". *Journal of Comparative Pathology*; 115: 415-428.
- Carrasco L, Bautista MJ, Gómez-Villamandos JC, Martín de las Mulas J, Chacón M, Wilkinson PJ, Sierra MA (1997a): "Development of microscopic lesions in splenic cords of pigs infected with African swine fever virus". *Veterinary Research*; 28: 93-99.
- Carrasco L, Chacón-M de Lara F, Martín de Las Mulas J, Gómez-Villamandos JC, Sierra MA, Villeda CJ, Wilkinson PJ (1997b): "Ultrastructural changes related to lymph node haemorrhages in acute African swine fever". *Research in Veterinary Science*; 62: 199-204.
- Carrasco L, Núñez A, Salguero FJ, Díaz San Segundo F, Sánchez-Cordón PJ, Gómez-Villamandos JC, Sierra MA (2002): "African swine fever: Expression of interleukin-1 alpha and tumour necrosis factor- alpha by pulmonary intravascular macrophages ". *J Com Pathol*; 126 (2-3): 194-201.
- Carrascosa JL, Carazo JM, Carrascosa AL, García N, Santisteban A, Viñuela E (1984): "General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles". *Virology*; 132(1):160-72.

- Carrascosa AL, del Val M, Santarén JF, Viñuela E (1985): "Purification and properties of African swine fever virus". *J Virol*; 54(2):337-44.
- Carrascosa AL, Bustos MJ, Galindo I, Viñuela E (1999): "Virus-specific cell receptors are necessary, but not sufficient, to confer cell susceptibility to African swine fever virus". *Arch Virol*; 144(7): 1309-21.
- Carrascosa AL, Bustos MJ, de Leon P (2011): "Methods for growing and titrating African swine fever virus: field and laboratory samples". *Curr Protoc Cell Biol*, Capítulo 26: Unidad 26.14.
- Casal I, Enjuanes L, Viñuela E (1984): "Porcine leukocyte cellular subsets sensitive to African swine fever virus in vitro". *J Virol*; 52(1):37-46.
- Castagnoli B (1969): "Diagnosi differenziale clinica ed anatomopatologica fra peste suina africana e classica". *Atti Soc Ital Sci Vet*; 23: 955-958.
- Chapman DA, Tcherepanov V, Upton C, Dixon LK (2008): "Comparison of the genome sequences of non-pathogenic and pathogenic African swine fever virus isolates". *J Gen Virol*; 89: 397-408.
- Chapman DA, Darby AC, Da Silva M, Upton C, Radford AD, Dixon LK (2011): "Genomic analysis of highly virulent Georgia 2007/1 isolate of African swine fever virus". *Emerg Infect Dis*; 4: 599-605.
- Coggins L (1974): "African swine fever virus. Pathogenesis". *Prog Med Virol*; 18(0):48-63.
- Cohen J (1960): "A coefficient of agreement for nominal scales". *Educational and Psychological Measurement*; 20 (1): 37-46.
- Costard S, Wieland B, de Glanville W, Jori F, Rowlands R, Vosloo W, Roger F, Pfeiffer DU, Dixon LK (2009): "African swine fever: how can global spread be prevented?". *Philos Trans R Soc Lond B: Biol Sci*; 364: 2683-2696.
- Costard S, Jones BA, Martínez-López B, Mur L, de la Torre A, Martínez M, Sánchez-Vizcaíno F, Sánchez-Vizcaíno JM, Pfeiffer DU, Wieland B (2013a): "Introduction of African swine fever into the European Union through illegal importation of pork and pork products". *PLoS One* 8; (4): e61104. doi: 10.1371/journal.pone.0061104.
- Costard S, Mur L, Lubroth J, Sánchez-Vizcaíno JM, Pfeiffer DU (2013b): "Epidemiology of African swine fever virus". *Virus Research*; 173: 191-197.
- Davies K, Goatley LC, Guinat C, Netherton CL, Gubbins S, Dixon LK, Reis AL (2015): "Survival of African Swine Fever Virus in Excretions from Pigs Experimentally Infected with the Georgia 2007/1 Isolate". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12381.

- De Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Elbers AR, Bouma A, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL (2012): "African swine fever virus excretion patterns in persistently infected animals: a quantitative approach". *Vet Microbiol*; 160: 327–340.
- De Carvalho Ferreira HC, Backer JA, Weesendorp E, Klinkenberg D, Stegeman JA, Loeffen WL (2013a): "Transmission rate of African swine fever virus under experimental conditions". *Veterinary Microbiology*; 165: 296–304.
- De Carvalho Ferreira HC, Weesendorp E, Quak S, Stegeman JA, Loeffen WL (2013b): "Quantification of airborne African swine fever virus after experimental infection". *Veterinary Microbiology*; 165: 243–251.
- De Carvalho Ferreira HC, Tudela Zúquete S, Wijnveld M, Weesendorp E, Jongejan F, Stegeman A, Loeffen WL (2014): "No evidence of African swine fever virus replication in hard ticks". *Ticks Tick Borne Dis*; 5(5):582-9.
- De la Torre A, Bosch J, Iglesias I, Muñoz MJ, Mur L, Martínez-López B, Martínez M, Sánchez-Vizcaíno JM (2013): "Assessing the Risk of African Swine Fever Introduction into the European Union by Wild Boar". *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12129.
- De León P, Bustos MJ, Carrascosa AL (2013): "Laboratory methods to study African swine fever virus". *Virus Res*; 173(1):168-79.
- De Tray DE (1957): "African swine fever in warthogs (*Phacochoerus aethiopicus*)". *J Am Vet Med Assoc*; 130: 537–540.
- De Tray DE (1963): "African swine fever" *Adv Vet Sci*; 8:299-333.
- De Villier EP, Gallardo C, Arias M, da Silva M, Upton C, Martín R, Bishop RP (2010): "Phylogenomic analysis of 11 complete African swine fever virus genome sequences". *Virology*; 400: 128–136.
- Diaz AV, Netherton CL, Dixon LK, Wilson AJ (2012): "African swine fever virus strain Georgia 2007/1 in *Ornithodoros erraticus* ticks". *Emerging Infectious Diseases*; 18: 1026-1028.
- Directorate-General for Health and Consumers of the European Commission (CE, DG-SANTE) Standing Committee on the Food Chain and Animal Health (SCOFCAH) Meeting, August, 2014. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/docs/20140821_asf_lithuania_en.pdf.
- Dixon LK, Bristow C, Wilkinson PJ, Sumption KJ (1990): "Identification of a Variable Region of the African Swine Fever Virus Genome that Has Undergone Separate DNA Rearrangements Leading to Expansion of Minisatellite-like Sequences". *J Mol Biol*; 216: 677-688.

- Dixon LK, Twigg SR, Baylis SA, Vydelingum S, Bristow C, Hammond JM, Smith GL (1994): "Nucleotide sequence of a 55 kbp region from the right end of the genome of a pathogenic African swine fever virus isolate (Malawi LIL20/1)". *J Gen Virol*; 75 (7):1655-84.
- Dixon LK, Costa JV, Escribano JM, Rock DL, Viñuela E, Wilkinson PJ (2000): "Family Asfarviridae". In: *Virus Taxonomy, 7th Report of the ICTV*. Van Regenmortel MHV, Fauquet CM, Bishop DHL (Eds.), Academic Press, San Diego, pp. 159–165.
- Dixon LK, Abrams CC, Bowick G, Goatley LC, Kay-Jackson PC, Chapman D, Liverani E, Nix R, Silk R, Zhang F (2004): "African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems". *Vet Immunol Immunopathol*; 100: 117–134.
- Dixon LK, Escribano JM, Martins C, Rock DL, Salas ML y col. (2005): "Asfarviridae". In: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, CM Fauquet, MA Mayo, J Maniloff, U Desselberger, LA Ball, Eds., Elsevier Academic Press, London, pp. 135-143.
- Dixon LK, Chapman DAG, Netherton CL, Upton C (2013): "African swine fever virus replication and genomics". *Virus Research*; 173: 3-14.
- Enjuanes L, Carrascosa AL, Moreno MA, Viñuela E (1976): "Titration of African swine fever (ASF) virus". *J Gen Virol*; 32(3):471-7.
- Escribano J, Tabares E (1987): "Proteins specified by African swine fever virus: V. Identification of immediate early, early and late proteins". *Arch Virol*; 92(3-4):221-32.
- Escribano JM, Pastor MJ, Sánchez-Vizcaíno JM (1989): "Antibodies to bovine serum albumin in swine sera: implications for false-positive reactions in the serodiagnosis of African swine fever". *Am J Vet Res*; 50(7):1118-22.
- Escribano JM, Galindo I, Alonso C (2013): "Antibody-mediated neutralization of African swine fever virus: myths and facts". *Virus Res*; 173(1):101-9.
- Esparza I, González JC, Viñuela E (1988): "Effect of interferon-alpha, interferon-gamma and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages". *J Gen Virol*; 69 (12):2973-80.
- European Food Safety Authority (EFSA) (2010): Panel on Animal Health and Welfare, 2010. Scientific opinion on African swine fever. *EFSA J* 8 (3), 149.
<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1556>.
- European Food Safety Authority (EFSA), (2014): Panel on Animal Health and Welfare. Scientific opinion on African swine fever. *EFSA J* 2014, 12:3628
<http://dx.doi.org/10.2903/j.efsa.2014.3628>.
- Everitt BS (1989): "Statistical Methods for Medical Investigation". New York. Oxford University Press. 989: 25–26.

- Fernández-Pinero J, Gallardo C, Elizalde M, Robles A, Gómez C, Bishop R, Heath L, Couacy-Hymann E, Fasina FO, Pelayo V, Soler A, Arias M (2013): "Molecular diagnosis of African Swine Fever by a new real-time PCR using universal probe library". *Transbound Emerg Dis*; 60(1):48-58.
- Forman AJ, Wardley RC, Wilkinson PJ (1982): "The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus". *Arch Virol*; 74(2-3):91-100.
- Gabriel C, Blome S, Malogolovkin A, Parilov S, Kolbasov D, Teifke JP, Beer M (2011): "Characterization of African swine fever virus Caucasus isolate in European wild boars". *Emerg Infect Dis*; 17(12):2342-5.
- Galindo I, Almazan F, Bustos MJ, Viñuela E, Carrascosa AL (2000). "African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells". *Virology*; 266(2):340-51.
- Galindo I, Hernaez B, Díaz-Gil G, Escribano JM, Alonso C (2008): "A179L, a viral Bcl-2 homologue, targets the core Bcl-2 apoptotic machinery and its upstream BH3 activators with selective binding restrictions for Bid and Noxa". *Virology*; 375(2):561-72.
- Gallardo Frontaura, C: "*Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico serológicos y moleculares de la Peste Porcina Africana*". Director: José Manuel Sánchez-Vizcaíno. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid, 2003.
- Gallardo C, Blanco E, Rodríguez JM, Carrascosa AL, Sánchez- Vizcaíno JM (2006): "Antigenic properties and diagnostic potential of African swine fever virus protein pp62 expressed in insect cells". *J Clin Microbiol*; 44: 950–956.
- Gallardo C, Mwaengo DM, Macharia JM, Arias M, Taracha EA, Soler A, Okoth E, Martín E, Kasiti J, Bishop RP (2009a): "Enhanced discrimination of African swine fever virus isolates through nucleotide sequencing of the p54, p72, and pB602L (CVR) genes". *Vir Gen*; 38: 85–95.
- Gallardo C, Reis AL, Kalema-Zikusoka G, Malta J, Soler A, Blanco E, Parkhouse RM, Leitao A (2009b): "Recombinant antigen targets for serodiagnosis of African swine fever". *Clin Vaccine Immunol*; 16: 1012–1020.
- Gallardo C, Soler A, Martín E, Pelayo V, Simón A, Arias M (2009c): "Report on molecular characterization of African swine fever virus Azerbaijan isolates". FAO report about the molecular characterization studies of ASFV isolates recovered from active outbreaks occurred in Azerbaijan in 2008. *FAO Empress* 33: 17-31.
- Gallardo C, Ademun AR, Nieto R, Nantima N, Arias M, Martín E, Pelayo V, Bishop RP (2011a): "Genotyping of African swine fever virus (ASFV) isolates associated with disease outbreaks in Uganda in 2007". *African Journal of Biotechnology*; 10(17): 3488-3497.

- Gallardo C, Anchuelo R, Pelayo V, Poudevigne F, Leon T, Nzoussi J, Bishop R, Pérez C, Soler A, Nieto R, Martín H, Arias M (2011b): "African swine fever virus p72 genotype IX in domestic pigs, Congo". *Emerg Infect Dis*; 17: 1556–1558.
- Gallardo C, Okoth E, Pelayo V, Anchuelo R, Martín E, Simón A, Llorente A, Nieto R, Soler A, Martín R, Arias M, Bishop, R.P (2011c): "African swine fever viruses with two different genotypes, both of which occur in domestic pigs, are associated with ticks and adult warthogs, respectively, at a single geographical site". *J Gen Virol*; 92: 432–444.
- Gallardo C, Nieto R, Martín E, Pelayo V, Arias M (2012a): "Validation of Indirect Immunoperoxidase Technique (IPT) as alternative confirmatory test for African swine fever antibody detection". IX International Congress of Veterinary Virology (ESVV), Madrid, España. 4-7 septiembre 2012.
- Gallardo C, Soler A, Nieto R, Mur L, Pérez C, Pelayo V, Martins C, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M (2012b): "Protection of European domestic pigs from Armenia virulent African swine fever virus by experimental immunisation using the attenuated and non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68". IX International Congress of Veterinary Virology (ESVV), Madrid, España. 4-7 septiembre 2012.
- Gallardo C, Soler A, Nieto R, Carrascosa AL, De Mia GM, Bishop RP, Martins C, Fasina FO, Couacy-Hymman E, Heath L, Pelayo V, Martín E, Simón A, Martín R, Okurut AR, Lekolol I, Okoth E, Arias M, (2013): "Comparative evaluation of novel African swine fever virus (ASF) antibody detection techniques derived from specific ASF viral genotypes with the OIE internationally prescribed serological tests". *Vet Microbiol*; 162(1):32-43.
- Gallardo C, Fernández-Pinero J, Pelayo V, Gazaev I, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nieto R, Fernández-Pacheco P, Bokhan S, Nevolko O, Drozhzhe Z, Pérez C, Soler A, Kolvasov D, Arias M (2014a): "Genetic variation among African swine fever genotype II viruses, eastern and central Europe". *Emerg Infect Dis*; 20(9):1544-7.
- Gallardo C, Nieto R, Pelayo V, Fernández-Pacheco P, Soler A, Pérez C, Martín E, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Tignon M, Fernández-Pinero J, Arias M (2014b): "Assessment of ASF diagnostic tests in domestic pig and wild boar sample analysis". Some considerations on Diagnostic Interpretation. In *Workshop on Laboratory Diagnosis of African and Classical Swine Fever*, 2–3 June, Valdeolmos, Madrid, 2014.
- Gallardo C, Nieto R, Soler A, Pelayo V, Fernández-Pinero J, Markowska-Daniel I, Pridotkas G, Nurmoja I, Granta R, Simón A, Pérez C, Martín E, Fernández-Pacheco P, Arias M (2015a): "Assessment of African Swine Fever Diagnostic Techniques as a Response to the Epidemic Outbreaks in Eastern European Union Countries: How To Improve Surveillance and Control Programs". *J Clin Microbiol*; 53(8):2555-65.

- Gallardo C, Soler A, Nieto R, Cano C, Pelayo V, Sánchez MA, Pridotkas G, Fernandez-Pinero J, Briones V, Arias M (2015b): "Experimental Infection of Domestic Pigs with African Swine Fever Virus Lithuania 2014 Genotype II Field Isolate". *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12346.
- Gallardo C, Soler A, Nieto R, Sánchez MA, Martins C, Pelayo V, Carrascosa A, Revilla Y, Simón A, Briones V, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M (2015c): "Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12431.
- Genovesi EV, Knudsen RC, Whyard TC, Mebus CA (1988): "Moderately virulent ASFV infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components". *Am J Vet Res*; 49: 338–344.
- Gershoni JM, Palade GE (1983): "Protein blotting: principles and applications". *Anal Biochem*; 131: 1-15.
- Giammarioli M, Pellegrini C, Casciari C, De Mia GM (2008): "Development of a novel hot-start multiplex PCR for simultaneous detection of classical swine fever virus, African swine fever virus, porcine circovirus type 2, porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine parvovirus". *Vet Res Commun*; 32(3):255-62.
- Giammarioli M, Gallardo C, Oggiano A, Iscaro C, Nieto R, Pellegrini C, Dei Giudici S, Arias M, De Mia GM (2011): "Genetic characterization of African swine fever viruses from recent and historical outbreaks in Sardinia (1978–2009)". *Virus Genes*; 42 (3): 377–387.
- Gogin A, Gerasimov V, Malogolovkin A, Kolbasov D (2013): "African swine fever in the North Caucasus region and the Russian Federation in years 2007–2012". *Virus Res*; 173: 198–203.
- Goller KV, Malogolovkin AS, Katorkin S, Kolbasov D, Titov I, Höper D, Beer M, Keil GM, Portugal R, Blome S (2015): "Tandem Repeat Insertion in African Swine Fever Virus, Russia, 2012". *Emerg Infect Dis*; 21(4): 731–732.
- Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, Ramiro-Ibáñez F, Ruiz-Gonzalvo F, Alonso C, Escribano JM (1996): "Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization". *J Virol*; 70: 5689–5694.
- Gómez-Puertas P, Rodríguez F, Oviedo JM, Brun A, Alonso C, Escribano JM (1998): "The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody mediated protective immune response". *Virology*; 243: 461–471.
- Gómez-Villamandos JC, Hervás J, Méndez A, Carrasco L, Martín de las Mulas J, Villeda CJ, Wilkinson PJ, Sierra MA (1995): "Experimental African swine fever: apoptosis of

- lymphocytes and virus replication in other cells". *Journal of General Virology*; 76: 2399-2405.
- Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Carrasco L, Chacón-Manrique de Lara F, Hervás J, Wilkinson PJ, Sierra MA (1998): "Thrombocytopenia associated with apoptotic megakaryocytes in a viral haemorrhagic syndrome induced by a moderately virulent strain of African swine fever virus". *Journal of Comparative Pathology*; 118: 1-13.
- Gómez-Villamandos JC, Bautista MJ, Sánchez-Cordón PJ, Carrasco L (2013): "Pathology of African swine fever: the role of monocyte-macrophage". *Virus Research*; 173: 140-149.
- González A, Calvo V, Almazán F, Almendral JM, Ramírez JC, de la Vega I, Blasco R, Viñuela E (1990): "Multigene families in African swine fever virus: family 360". *J Virol*; 64(5):2073-81.
- Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Del Aguila C, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y (2006a): "The viral protein A238L inhibits TNF-alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway". *J Immunol*; 176(1):451-62.
- Granja AG, Sabina P, Salas ML, Fresno M, Revilla Y (2006b): "Regulation of inducible nitric oxide synthase expression by viral A238L-mediated inhibition of p65/RelA acetylation and p300 transactivation". *J Virol*; 80(21):10487-96.
- Guinat C, Reis A, Netherton CL, Goatley L, Pfeiffer DU, Dixon L (2014): "Dynamics of African swine fever virus shedding and excretion in domestic pigs infected by intramuscular inoculation and contact transmission". *Vet Res*; 45(1):93.
- Gulenkin VM, Korennoy FI, Karaulov AK, Dudnikov SA (2011): "Cartographical analysis of African swine fever outbreaks in the territory of the Russian Federation and computer modeling of the basic reproduction ratio". *Preventive Veterinary Medicine*; 102: 167–174.
- Haresnape JM, Mamu FD (1986): "The distribution of ticks of the *Ornithodoros moubata* complex (Ixodoidea: Argasidae) in Malawi, and its relation to African swine fever epizootiology". *J Hyg (Lond)*; 96(3):535-44.
- Haresnape JM, Wilkinson PJ (1989): "A study of African swine fever virus-infected ticks (*Ornithodoros Moubata*) collected from 3 villages in the ASF enzootic area of Malawi following an outbreak of the disease in domestic pigs". *Epidemiol Infect*; 102: 507–522.
- Hess WR (1971): "African swine fever virus". *Virol Monog*; 9:1-33.
- Hess WR, Endris RG, Haslett TM, Monahan MJ, McCoy JP (1987): "Potential arthropod vectors of African swine fever virus in North America and the Caribbean basin". *Vet Parasitol*; 26(1-2): 145-155.
- Heuschele WP, Coggins L (1965): "Isolation of African swine fever virus from a giant forest hog". *Bull Epizoot Dis Afr*; 13(3):255-6.

- Heuschele WP, Coggins L, Stone SS (1966): "Fluorescent antibody studies on African swine fever virus". *Am J Vet Res*; 27(117):477-84.
- Hjertner B, Meehan B, McKillen J, McNeilly F, Belák S (2005): "Adaptation of an Invader assay for the detection of African swine fever virus DNA". *J Virol Methods*; 124(1-2):1-10.
- Hurtado C, Bustos MJ, Granja AG, de León P, Sabina P, López-Viñas E, Gómez-Puertas P, Revilla Y, Carrascosa AL (2011): "The African swine fever virus lectin EP153R modulates the surface membrane expression of MHC class I antigens". *Arch Virol*; 156(2):219-34.
- Iglesias I, Montes F, Muñoz MJ, Arias M, Gogin A, Kolbasov D, de la Torre A (2014): "Role of wild boars and domestic pigs in the spread of African swine fever in the Russian Federation (2007-2013)". 8th Annual EPIZONE meeting, 23-25 September 2014, Copenhagen, Denmark. Posters African Swine fever.
- Iglesias I, Muñoz MJ, Montes F, Perez A, Gogin A, Kolbasov D, de la Torre A (2015): "Reproductive Ratio for the Local Spread of African Swine Fever in Wild Boars in the Russian Federation". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12337.
- Irusta PM, Borca MV, Kutish GF, Lu Z, Caler E, Carrillo C, Rock DL (1996); "Amino acid tandem repeats within a late viral gene define the central variable region of African swine fever virus". *Virology*; 220: 20–27.
- Iyer LM, Balaji S, Koonin EV, Aravind L (2006): "Evolutionary genomics of nucleo-cytoplasmic large DNA viruses". *Virus Res*; 117(1):156-84.
- James HE, Ebert K, McGonigle R, Reid SM, Boonham N, Tomlinson JA, Hutchings GH, Denyer M, Oura CA, Dukes JP, King DP (2010): "Detection of African swine fever virus by loop-mediated isothermal amplification". *J Virol Methods*; 164: 68–74.
- Jhonson TK, Yuen L, Denell RE, Consigli R (1983): "Efficient transfer of proteins from acetic-Urea and isoelectric-focusing gels to nitrocellulose membrane filters with retention of protein antigenicity". *Biochemistry*; 133: 126-131.
- Jori F, Bastos AD (2009): "Role of wild suids in the epidemiology of African swine fever". *EcoHealth*; 6: 296–310.
- Jori F, Vial L, Penrith ML, Perez-Sanchez R, Etter E, Albina E, Michaud V, Roger F (2013): "Review of the sylvatic cycle of African swine fever in sub-Saharan Africa and the Indian ocean". *Virus Res*; 173: 212-227.
- King DP, Reid SM, Hutchings GH, Grierson SS, Wilkinson PJ, Dixon LK, Bastos AD, Drew TW (2003): "Development of a TaqMan PCR assay with internal amplification control for the detection of African swine fever virus". *J Virol Methods*; 107 (1): 53–61.

- King K, Chapman D, Argilaguët JM, Fishbourne E, Hutet E, Cariolet R, Hutchings G, Oura CA, Netherton CL, Moffat K, Taylor G, Le Potier MF, Dixon LK, Takamatsu HH (2011): "Protection of European domestic pigs from virulent African isolates of African swine fever virus by experimental immunization". *Vaccine*; 29: 4593–4600.
- Kleiboeker SB, Scoles GA, (2001): "Pathogenesis of African swine fever virus in *Ornithodoros* ticks". *Anim Health Res Rev*; 2: 121–128.
- Kollnberger SD, Gutierrez-Castañeda B, Foster-Cuevas M, Corteyn A, Parkhouse RM (2002): "Identification of the principal serological immunodeterminants of African swine fever virus by screening a virus cDNA library with antibody". *J Gen Virol*; 83: 1331–1342.
- Koressaar T, Remm M (2007): "Enhancements and modifications of primer design program Primer3". *Bioinformatics*; 23(10):1289-91.
- Kowalenko J, Sidorow M, Burba L (1965): "African swine fever and control measures". *Int Zeitschr Landwirtschaft Deutsche*; 1: 47-52.
- Krug PW, Holinka LG, O'Donnell V, Reese B, Sanford B, Fernández-Sainz I, Gladue DP, Arzt J, Rodríguez L, Risatti GR, Borca MV (2014): "The progressive adaptation of a Georgian isolate of African swine fever virus to Vero cells leads to a gradual attenuation of virulence in swine corresponding with major modifications of the viral genome". *J Virol*; 89(4):2324-32.
- Kurinnov VV, Belyanini SA, Vasilyev AP, Gazaev IKh, Gogin AE, Kolbasov DV (2014): "Results of multiple laboratory screening of samples from wild boars in the populations of African swine fever risk in Smolensk region (2013-2014)". In *Workshop on Laboratory Diagnosis of African and Classical Swine Fever*, 2–3 June, Valdeolmos, Madrid, 2014.
- Lange M, Siemen H, Blome S, Thulke HH (2014): "Analysis of spatio-temporal patterns of African swine fever cases in Russian wild boar does not reveal an endemic situation". *Prev Vet Med*; 117(2):317-25.
- Leitão A, Cartaxeiro C, Coelho R, Cruz B, Parkhouse RM, Portugal F, Vigário JD, Martins CL (2001): "The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective antiviral immune response". *J Gen Virol*; 82: 513–523.
- Lewis T, Zsak L, Burrage TG, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL (2000): "An African swine fever virus ERV1-ALR homologue, 9GL, affects virion maturation and viral growth in macrophages and viral virulence in swine". *J Virol*; 74: 1275–1285.
- López-Otín C, Freije JM, Parra F, Méndez E, Viñuela E (1990): "Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus". *Virology*; 175(2):477-84.

- Lubisi BA, Bastos AD, Dwarka RM, Vosloo W (2005): "Molecular epidemiology of African swine fever in East Africa" *Arch Virol*; 150: 2439–2452.
- Lubisi BA, Bastos AD, Dwarka RM, Vosloo W (2007): "Intra-genotypic resolution of African swine fever viruses from an East African domestic pig cycle: a combined p72-CVR approach". *Virus Genes*; 35(3):729-35.
- Lubisi BA, Dwarka RM, Meenowa D, Jaumally R (2009): "An investigation into the first outbreak of African swine fever in the Republic of Mauritius". *Transbound Emerg Dis*; 56(5):178-88.
- Malmquist W, Hay D (1960): "Hemadsorption and cytopathic effect produced by African swine fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures". *Am J Vet Res*; 21: 104-108.
- Malogolovkin A, Yelsukova A, Gallardo C, Tsybanov S, Kolbasov D (2012): "Molecular characterization of African swine fever virus isolates originating from outbreaks in the Russian Federation between 2007 and 2011". *Vet Microbiol*; 158: 415–419.
- Mannelli A, Sotgia S, Patta C, Sarria A, Madrau P, Sanna L, Firinu A, Laddomada A (1997): "Effect of husbandry methods on seropositivity to African swine fever virus in Sardinian swine herds". *Prev Vet Med*; 32(3-4):235-41.
- Manso-Ribeiro JJ, J. A. Azevedo JA (1961): "La peste porcine africaine au Portugal". *Bull Off Int Epizoot*; 55: 88–108.
- Manso-Ribeiro J, Nunes-Petisca JL, Lopez-Fraza F, Sobral M (1963): "Vaccination against ASF". *Bull Off Int Epizoot*; 60: 921–937.
- Manual Práctico de operaciones en la lucha contra la Peste Porcina Africana (PPA). REV.- Enero 2013. Dirección General de sanidad de la Producción Agraria, Subdirección General de sanidad e higiene animal y trazabilidad, Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, Gobierno de España.
- Martínez-López B, Perez AM, Feliziani F, Rolesu S, Mur L, Sánchez-Vizcaíno JM (2015): "Evaluation of the risk factors contributing to the African swine fever occurrence in Sardinia, Italy". *Front Microbiol*; 6: 314.
- Martins CL, Leitão AC (1994): "Porcine immune responses to African swine fever virus (ASFV) infection". *Vet Immunol Immunopathol*; 43(1-3):99-106.
- McCullough KC, Schaffner R, Fraefel W, Kihm U (1993): "The relative density of CD44-positive porcine monocytic cell populations varies between isolations and upon culture and influences susceptibility to infection by African swine fever virus". *Immunol Lett*; 37(1):83-90.

- McKillen J, McMenamy M Hjertner B, McNeilly F, Uttenthal A, Gallardo C, Adair B, Allan G (2010): "Sensitive detection of African swine fever virus using real-time PCR with a 5' conjugated minor groove binder probe". *J Virol Methods*; 168 (1–2): 141–146.
- McVicar J W, Mebus CA, Becker HN, Belden RC, Gibbs EP (1981): "Induced African swine fever in feral pigs". *J Am Vet Med Assoc*; 179: 441–446.
- McVicar JW (1984): "Quantitative aspects of the transmission of African swine fever". *American Journal of Veterinary Research*; 45: 1535-1541.
- Mebus CA, Dardiri AH, Hamdy FM, Ferris DH, Hess WR, Callis JJ (1978): "Some characteristics of african swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic". *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*; 82:232-6.
- Mebus CA, Dardiri AH (1979): "Additional characteristics of disease caused by the African swine fever viruses isolated from Brazil and the Dominican Republic". *Proc Annu Meet U S Anim Health Assoc*; 83:227-39.
- Mebus CA, Dardiri AH (1980): "Western isolates of African swine fever virus: asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation". *Am J Vet Res*; 41: 1867–1869.
- Mebus CA, House C, Ruiz Gonzalvo F, Pined, JM, Tapiador J, Pire JJ, Bergada J, Yedloutschnig RJ, Sahu S, Becerra V, Sánchez-Vizcaíno JM (1993): "Survival of Foot - and - mouth disease, African swine fever, and Hog cholera viruses in Spanish Serrano cured hams and Iberian cured hams, shoulders and loins". *Food Microbiology*; 10: 133 - 143.
- Mebus C, Arias M, Pineda J, Tapiador J, House J, Sánchez-Vizcaíno JM (1997): "Survival of several porcine viruses in Spanish dry-cured meat products". *Food Chemistry*; 59 (4): 555-559.
- Montgomery ER (1921): "On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony)". *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*; 34.
- Moulton J, Coggins L (1968): "Comparison of lesions in acute and chronic African swine fever". *Cornell Vet*; 58(3):364-88.
- Mulumba-Mfumum LK, Goatley LC, Saegerman C, Takamatsu HH, Dixon LK (20015): "Immunization of African Indigenous Pigs with Attenuated Genotype I African swine fever Virus OURT88/3 Induces Protection Against Challenge with Virulent Strains of Genotype I". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12303.
- Mur L, Boadella M, Martínez-López B, Gallardo C, Gortazar C, Sánchez-Vizcaíno JM (2012a): "Monitoring of African swine fever in the wild boar population of the most recent endemic area of Spain". *Transbound Emerg Dis*; 59(6):526-31.

- Mur L, Martínez-López B, Martínez-Avilés M, Costard S, Wieland B, Pfeiffer DU, Sánchez-Vizcaíno JM (2012b): "Quantitative risk assessment for the introduction of African swine fever virus into the European Union by legal import of live pigs". *Transboundary and Emerging Diseases*; 59: 134-144.
- Mur L, Martínez-López B, Sánchez-Vizcaíno JM (2012c): "Risk of African swine fever introduction into the European Union through transport-associated routes: returning trucks and waste from international ships and planes". *BMC Veterinary Research*; 8: 149.
- Mur L, Gallardo C, Soler A, Zimmermann J, Pelayo V, Nieto R, Sánchez-Vizcaíno JM, Arias M (2013): "Potential use of oral fluid samples for serological diagnosis of African swine fever". *Veterinary Microbiology*; 165: 135-139.
- Mur L, Atzeni M, Martínez-López B, Feliziani F, Rolesu S, Sánchez-Vizcaíno JM (2014a): "Thirty-Five-Year Presence of African Swine Fever in Sardinia: History, Evolution and Risk Factors for Disease Maintenance". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12264.
- Mur L, Igolkin A, Varentsova A, Pershin A, Remyga S, Shevchenko I, Zhukov I, Sánchez-Vizcaíno JM (2014b): "Detection of African Swine Fever Antibodies in Experimental and Field Samples from the Russian Federation: Implications for Control". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12304.
- Mur L, Martínez-López B, Costard S, de la Torre A, Jones BA, Martínez M, Sánchez-Vizcaíno F, Muñoz MJ, Pfeiffer DU, Sánchez-Vizcaíno JM, Wieland B (2014c): "Modular framework to assess the risk of African swine fever virus entry into the European Union". *BMC Veterinary Research*; 10: 145.
- Neal Burnette W (1981): "Western Blotting:" Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radio-iodinated protein". *A Anal Biochem*; 112: 195-203.
- Neilan JG, Lu Z, Afonso CL, Kutish GF, Sussman MD, Rock DL (1993): "An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1". *J Virol*; 67(7):4391-4.
- Neilan JG, Zsak L, Lu Z, Burrage TG, Kutish GF, Rock DL (2004): "Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection". *Virology*; 319: 337-342.
- Nigsch A, Costard S, Jones BA, Pfeiffer DU, Wieland B (2013): "Stochastic spatio-temporal modelling of African swine fever spread in the European Union during the high risk period". *Prev Vet Med*; 108(4):262-75.

- Nix RJ, Gallardo C, Hutchings G, Blanco E, Dixon LK (2006): "Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions". *Arch Virol*; 151(12): 2475–2494.
- Nogal ML, González de Buitrago G, Rodríguez C, Cubelos B, Carrascosa AL, Salas ML, Revilla Y (2001): "African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells". *J Virol*; 75(6):2535-43.
- Oganesyan AS, Petrova ON, Korennoy FI, Bardina NS, Gogin AE, Dudnikov SA (2013): "African swine fever in the Russian Federation: spatio-temporal analysis and epidemiological overview". *Virus Res*; 173: 204–211.
- OIE, 2015a. Código Sanitario para los Animales Terrestres 2015. Peste Porcina Africana; Vol2, Capítulo 15.1:
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahc/2010/chapitre_asf.pdf
- OIE, 2015b. Peste Porcina Africana. Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de las Vacunas para los Animales Terrestres (2015), versión adoptada en mayo de 2012. Office International des Epizooties, Paris, France (capítulo 2.8.1).
http://www.oie.int/fileadmin/Home/esp/Health_standards/tahm/2.08.01_Peste_porcina_africana.pdf
- OIE: 5720. World Organisation for Animal Health 2007: African swine fever in Georgia. Immediate notification ref OIE: 5720.
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Reviewreport/Review?reportid=5720
- OIE: 12168. World Organisation for Animal Health 2012: African swine fever in Ukraine. Immediate notification ref OIE: 12168.
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000012168_20120731_134719.pdf
- OIE: 13663. World Organisation for Animal Health 2013. African swine fever in Belarus. Immediate notification ref OIE: 13663.
http://www.oie.int/wahis_2/temp/reports/en_imm_0000013663_20130624_102939.pdf
- OIE: 14625. World Organisation for Animal Health 2014. African swine fever in Ukraine. Immediate notification ref OIE: 14625.
http://web.oie.int/wahis/reports/en_imm_0000012168_20120731_134719.pdf.
- OIE, Informe de situación:
http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.
- Oleaga-Pérez A, Pérez-Sánchez R, Encinas-Grandes A (1990): "Distribution and biology of *Ornithodoros erraticus* in parts of Spain affected by African swine fever". *Vet Rec*; 126 (2): 32–37.

- Onisk DV, Borca MV, Kutish G, Kramer E, Irusta P, Rock DL (1994): "Passively transferred African swine fever virus antibodies protect swine against lethal infection". *Virology*; 198: 350–354.
- Ortín J, Viñuela E (1977): "Requirement of cell nucleus for African swine fever virus replication in Vero cells". *J Virol*; 21(3):902-5.
- Ortín J, Enjuanes L, Viñuela E (1979): "Cross-links in African swine fever virus DNA". *J Virol*; 31(3):579-83.
- Oura CA, Powell PP, Anderson E, Parkhouse RM (1998a): "The pathogenesis of African swine fever in the resistant bushpig". *J Gen Virol*; 79 (6):1439-43.
- Oura CA, Powell PP, Parkhouse RM (1998b): "African swine fever: a disease characterized by apoptosis". *J Gen Virol*; 79 (6):1427-38.
- Oura CA, Denyer MS, Takamatsu H, Parkhouse RM (2005): "In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus". *J Gen Virol*; 86: 2445–2450.
- Oura CA, Edwards L, Batten CA (2013): "Virological diagnosis of African swine fever-- comparative study of available tests". *Virus Res*; 173: 150-158.
- Oviedo JM, Rodríguez F, Gómez-Puertas P, Brun A, Gómez N, Alonso C, Escribano JM (1997): "High level expression of the major antigenic African swine fever virus proteins p54 and p30 in baculovirus and their potential use as diagnostic reagents". *J Virol Methods*; 64: 27–35.
- Owolodun OA, Yakubu B, Antiabong JF, Ogedengbe ME, Luka PD, John Audu B, Ekong PS, Shamaki D (2010): "Spatio-temporal dynamics of African swine fever outbreaks in Nigeria, 2002-2007". *Transbound Emerg Dis*; 57(5):330-9.
- Pan IC, Shimizu M, Hess W (1978): "African swine fever: microplaque assay by an immunoperoxidase method". *American Journal of Veterinary Research*; 39: 491-497.
- Pan IC, Shimizu M, Hess WR (1980): "Replication of African swine fever virus in cell cultures". *Am J Vet Res*; 41(9):1357-67.
- Pan IC, Huang TS, Hess WR (1982): "New method of antibody detection by indirect immunoperoxidase plaque staining for serodiagnosis of African swine fever". *J Clin Microbiol*; 16(4):650-5.
- Pan IC, Hess WR (1984): "Virulence in African swine fever: its measurement and implications". *American Journal of Veterinary Research*; 45: 361-366.

- Pan IC (1992): "African swine fever virus: generation of subpopulations with altered immunogenicity and virulence following passage in cell cultures". *J Vet Med Sci*; 54(1):43-52.
- Pastor M, Laviada M, Sánchez-Vizcaíno JM, Escribano J (1989): "Detection of African swine fever virus antibodies by immunoblotting assay". *Canadian Journal of Veterinary Research*; 53: 105-107.
- Pastor MJ, Escribano JM (1990): "Evaluation of sensitivity of different antigen and DNA-hybridization methods in African swine fever virus detection". *J Virol Methods*; 28(1):67-77.
- Pastor MJ, Arias M, Escribano JM (1990): "Comparison of two antigens for use in an enzyme-linked immunosorbent assay to detect African swine fever antibody". *Am J Vet Res*; 51(10):1540-3.
- Penrith ML, Thomson GR, Bastos ADS, (2004a): "African swine fever". In: *Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Coetzer JAW, Tustin RC (Eds.). Oxford University Press, Cape Town, South Africa, pp. 1088–1119.
- Penrith ML, Thomson GR, Bastos AD, Phiri OC, Lubisi BA, Du Plessis EC, Macome F, Pinto F, Botha B, Esterhuysen J (2004b). "An investigation into natural resistance to African swine fever in domestic pigs from an endemic area in southern Africa". *Rev Sci Tech*; 23: 965–977.
- Penrith ML, Vosloo W (2009): "Review of African swine fever: transmission, spread and control". *Journal of the South African Veterinary Association*; 80: 58-62.
- Penrith ML, Vosloo W, Jori F, Bastos AD (2013): "African swine fever virus eradication in Africa". *Virus Res*; 173: 228-246.
- Pérez J, Fernández AI, Sierra MA, Herráez P, Fernández A, De las Mulas JM (1998): "Serological and immunohistochemical study of African swine fever in wild boar in Spain". *Vet Rec*; 143: 136–139.
- Pérez-Filgueira DM, González-Camacho F, Gallardo C, Resino-Talaván P, Blanco E, Gómez-Casado E, Alonso C, Escribano JM (2006): "Optimization and validation of recombinant serological tests for African Swine Fever diagnosis based on detection of the p30 protein produced in *Trichoplusia ni* larvae". *J Clin Microbiol*; 44: 3114–3121.
- Pérez-Sánchez R, Astigarraga A, Oleaga-Pérez A, Encinas-Grandes A (1994): "Relationship between the persistence of African swine fever and the distribution of *Ornithodoros erraticus* in the province of Salamanca, Spain. *Vet Rec*. 1994 Aug 27; 135(9):207-9.
- Petrov A, Schotte U, Pietschmann J, Dräger C, Beer M, Anheyer-Behmenburg H, Goller KV, Blome S (2014): "Alternative sampling strategies for passive classical and African swine

- fever surveillance in wild boar". *Vet Microbiol*; 173(3-4):360-5. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.07.030.
- Phologane SB, Bastos AD, Penrith ML, (2005): "Intra- and inter-genotypic size variation in the central variable region of the 9RL open reading frame of diverse African swine fever viruses". *Virus Genes*; 31(3): 357-360.
- Pietschmann J, Guinat C, Beer M, Pronin V, Tauscher K, Petrov A, Keil G, Blome S (2015): "Course and transmission characteristics of oral low-dose infection of domestic pigs and European wild boar with a Caucasian African swine fever virus isolate". *Archives of Virology*; 160(7): 1657-1667.
- Plowright W, Parker J, Peirce MA (1969): "African swine fever virus in ticks (*Ornithodoros moubata*, *murray*) collected from animal burrows in Tanzania". *Nature*; 221:1071–1073.
- Plowright W, (1977): "Vector transmission of African swine fever virus". In *Agricultural Research Seminar on Classical Swine Fever and African Swine Fever*, Hanover 1976U, Luxemburg: Directorate General for Agriculture, C.E.E. Eur. 5904, pp.575-587.
- Plowright W, Thomson GR, Naser JA (1994): "African swine fever". In: *Infectious Diseases of Livestock with Special Reference to Southern Africa*. Coetzer JAW, Thomson GR, Tustin, RC (Eds.). Oxford University Press, Cape Town, pp. 567–599.
- Polo Jover F, Sánchez Botija C (1961): "La peste porcina africana en España". *Bull OIE*; 55: 107-147.
- Polo Jover F (1966): "Peste Porcina Africana". *Monografías agrarias*; 15:9-89.
- Portugal R, Coelho J, Höper D, Little NS, Smithson C, Upton C, Martins C, Leitão A, Keil GM (2015): "Related strains of African swine fever virus with different virulence: genome comparison and analysis". *J Gen Virol*; 96(2):408-19.
- Ramiro-Ibáñez F, Ortega A, Brun A, Escribano JM, Alonso C (1996): "Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection". *J Gen Virol*; 77 (9):2209-19.
- Prados FJ, Viñuela E, Alcamí A (1993): "Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of African swine fever virus". *J Virol* ; 67(5):2475-85.
- Rahimi P, Sohrabi A, Ashrafi Helan J, Edalat R, Alamdari M, Masoudi M, Mostofi S, Azadmanesh K (2010): "Emergence of African swine fever virus, north western Iran". *Emerging Infectious Diseases*; 16 (12): 1946–1948.
- Randriamparany T, Kouakou KV, Michaud V, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Le Potier MF, Rabenarivahiny R, Couacy-Hymann E, Raherimandimby M, Albina E (2014): "African Swine Fever Diagnosis Adapted to Tropical Conditions by the Use of Dried-blood Filter Papers". *Transbound Emerg Dis*. doi: 10.1111/tbed.12295.

- Redondo H, Fernández-Pinero J, Gallardo C, Sastre P, Ranz A, Rodríguez MJ, Arias M, Rueda P, Sanz A (2014): "Diagnostic tools for rapid detection of ASFV in blood samples: lateral flow assay and Real Time PCR". 3rd European EAVLD Congress - Pisa (Italy), October 12-15, 2014.
- Rennie L, Wilkinson PJ, Mellor PS (2001): "Transovarial transmission of African swine fever virus in the argasid tick *Ornithodoros moubata*". *Med Vet Entomol*; 15(2):140-6.
- Revilla Y, Pena L, Mampaso F, Viñuela E, Martínez-Alonso C (1994): "Swine-reconstituted SCID mice as a model for African swine fever virus infection". *J Gen Virol*; 75 (8):1983-8.
- Revilla Y, Cebrián A, Baixeras E, Martínez C, Viñuela E, Salas ML (1997): "Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain". *Virology*; 228(2):400-4.
- Rodríguez F, Alcaraz C, Eiras A, Yáñez RJ, Rodríguez JM, Alonso C, Rodríguez JF, Escribano JM (1994) "Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54". *J Virol*; 68(11):7244-52.
- Rodríguez I, Nogal ML, Redrejo-Rodríguez M, Bustos MJ, Salas ML (2009): "The African Swine Fever Virus Virion Membrane Protein pE248R Is Required for Virus Infectivity and an Early Postentry Event" *J Virol*; 83(23): 12290–12300.
- Rodríguez JM, Salas ML, Viñuela E (1992): "Genes homologous to ubiquitin-conjugating proteins and eukaryotic transcription factor SII in African swine fever virus". *Virology*; 186: 40–52.
- Rodríguez JM, Yáñez RJ, Almazán F, Viñuela E, Rodríguez JF (1993a): "African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells". *J Virol*; 67: 5312–5320.
- Rodríguez JM, Yáñez RJ, Rodríguez JF, Viñuela E, Salas ML (1993b): "The DNA polymerase-encoding gene of African swine fever virus: sequence and transcriptional analysis". *Gene*; 136(1-2): 103-10.
- Rodríguez JM, Salas ML, Viñuela E (1996): "Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus". *J Virol*; 70(12): 8584-9.
- Roelandt S, Van der Stede Y, D'hondt B, Koenen F (2015): "The Assessment of African Swine Fever Virus Risk to Belgium Early 2014, using the Quick and Semiquantitative Pandora Screening Protocol". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12365.
- Roger F, Ratovonjato J, Vola P, Uilenber G (2001): "*Ornithodoros porcinus* ticks, bushpigs, and African swine fever in Madagascar". *Exp Appl Acarol*; 25(3):263-9.

- Rojo G, García-Beato R, Viñuela E, Salas ML, Salas J (1999): "Replication of African swine fever virus DNA in infected cells". *Virology*; 257(2):524-36.
- Ronish B, Hakhverdyan M, Stahl K, Gallardo C, Fernández-Pinero J, Belák S, Leblanc N, Wangh L (2011): "Design and verification of a highly reliable Linear-After-The-Exponential PCR (LATE-PCR) assay for the detection of African swine fever virus". *J Virol Methods*; 172 (1–2): 8–15.
- Rosell R, San Gabriel A, Pérez y Rozas AM, Seculi J, Gaya A (1986): "Aplicación del DMAB y MBTH como sustrato, y expresión de resultados en la técnica ELISA, para diagnóstico de portadores de peste porcina africana". *International Pig Veterinary Society*; 15-18 de julio. Barcelona (Spain).
- Rowlands RJ, Michaud V, Heath L, Hutchings G, Oura C, Vosloo W, Dwarka R, Onashvili T, Albina E, Dixon LK (2008): "African swine fever virus isolate, Georgia, 2007". *Emerg Infect Dis*; 14(12):1870-4.
- Ruiz-Gonzalvo F, Carnero ME, Bruyel V (1983): "Immunological responses of pigs to partially attenuated African swine fever virus and their resistance to virulent homologous and heterologous viruses". In: *African Swine Fever*. Wilkinson PJ (Ed.). CEC/FAO Research Seminar. Sardinia. September 1981. 206–216.
- Salas ML, Rey-Campos J, Almendral JM, Talavera A, Viñuela E (1986): "Transcription and translation maps of African swine fever virus". *Virology*; 152(1):228-40.
- Salas ML, Rodríguez JM, Dixon LK (2012): "Vaccine against African swine fever virus, based on replication deficient recombinant viruses". *Patentes CMB*; WO2012107614 A1.
- Salas ML, Andrés G (2013): "African swine fever virus morphogenesis". *Virus Research*; 173: 29-41.
- Salguero FJ, Sánchez-Cordón PJ, Sierra MA, Jover A, Núñez A, Gómez-Villamandos JC (2004): "Apoptosis of thymocytes in experimental African Swine Fever virus infection". *Histol Histopathol*; 19(1):77-84.
- Salguero FJ, Gil S, Revilla Y, Gallardo C, Arias M, Martins C (2008): "Cytokine mRNA expression and pathological findings in pigs inoculated with African swine fever virus(E-70) deleted on A238L". *Vet Immunol Immunopathol*; 124:107–119.
- Sánchez EG, Quintas A, Pérez-Núñez D, Nogal M, Barroso S, Carrascosa ÁL, Revilla Y (2012): "African swine fever virus uses macropinocytosis to enter host cells". *PLoS Pathog*; 8(6):e1002754. doi: 10.1371/journal.ppat.1002754.
- Sánchez Botija C (1963): "La Peste Suina". *Zooprofilassi*; 18: 578–607.

- Sánchez Botija C (1970): "Diagnosis of African swine fever by immunofluorescence". *Bull Off Int Epizoot*; 73(11):1025-44.
- Sánchez Botija C (1982): "Peste porcina africana. Nuevos desarrollos". *Rev sci tech Off int Epiz*; 1 (4): 991-1029.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Martín L, Ordás A (1979): "Adaptación y evaluación del enzimoimmunoensayo para la detección de anticuerpos de Peste Porcina Africana". *Laboratorio*; 67 (499): 311-319.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Slauson DO, Ruiz-Gonzalvo F, Valero F (1981): "Lymphocyte function and cell-mediated immunity in pigs with experimentally induced African swine fever". *Am J Vet Res*; 42(8):1335-41.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Tabarés E, Salvador E, Sánchez Botija A (1982): "Semipurified structural viral protein for the detection of African swine fever antibodies by the indirect ELISA technique". *Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*; 22: 214-222.
- Sánchez-Vizcaíno JM (1986): "African swine fever diagnosis". In *African Swine Fever*. Becker J (Ed) Boston; Martinus Nijhoff. pp. 63-71.
- Sánchez-Vizcaíno JM (1999): "African swine fever". In: *Diseases of Swine, 8th edn*. Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ (Eds.). Iowa State University Press, Ames, pp 93-102.
- Sánchez-Vizcaíno JM (2006): "African swine fever". In: *Diseases of Swine, 9th edn*. Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (Eds.). Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, pp. 291-298.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Martínez-López B, Martínez-Avilés M, Martins C, Boinas F, Vial L, Michaud V, Jori F, Etter E, Albina E, Roger F (2009): "Scientific review on African swine fever". *EFSA Scientific Report*, pp 1-141.
- Sánchez-Vizcaíno y Arias M (2012a): "African swine fever". In: *Diseases of swine, 10th edn*. Zimmerman J, Karriker LA, Ramirez A, Schwartz KJ, Stevenson GW (Eds.). John Wiley and Sons, United States of America. pp. 396-404.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B (2012b): "African swine fever: an epidemiological update". *Transbound Emerg Dis*; 59 Suppl 1:27-35.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L (2013a): "African swine fever diagnosis update". In: *Vaccines and Diagnostics for Transboundary Animal Diseases*. Roth JA, Richt JA, Morozov IA (Eds.). Karger, Basel, pp. 159-165.
- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Martínez-López B (2013b): "African swine fever (ASF): five years around Europe". *Veterinary Microbiology*; 26: 45-50.

- Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Gómez-Villamandos JC, Carrasco L (2015): "An Update on the Epidemiology and Pathology of African Swine Fever". *J Comp Pathol*; 152(1):9-21.
- Simón-Mateo C, Andrés G, Almazán F, Viñuela E (1997): "Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62". *J Virol*; 71(8):5799-804.
- Simón-Mateo C, Andrés G, Viñuela E (1993): "Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus". *EMBO J*; 12(7):2977-87.
- Silk RN, Bowick GC, Abrams CC, Dixon LK (2007): "African swine fever virus A238L inhibitor of NF-kappaB and of calcineurin phosphatase is imported actively into the nucleus and exported by a CRM1-mediated pathway". *J Gen Virol*; 88(Pt 2):411-9.
- Sogo JM, Almendral JM, Talavera A, Viñuela E (1984): "Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA". *Virology*; 133(2):271-5.
- Steiger I, Ackermann M, Mettraux C, Kihm U (1992): "Rapid and biologically safe diagnosis of African swine fever virus". *J Clin Microbiol*; 30: 1–8.
- Stone SS, Hess WR (1967): "Antibody response to inactivated preparations of African swine fever virus in pigs". *Am J Vet Res*; 28: 475–481.
- Schlafer DH, Mebus CA, McVicar JW (1984): "African swine fever in neonatal pigs: Passively acquired protection from colostrum or serum of recovered pigs". *Am J Vet Res*; 45: 1367–1372.
- Sumption KJ, Hutchings GH, Wilkinson PJ, Dixon LK (1990): "Variable regions on the genome of Malawi isolates of African swine fever virus". *J Gen Virol*; 71: 2331–2340.
- Sun H, Jacobs SC, Smith GL, Dixon LK, Parkhouse RM (1995): "African swine fever virus gene j13L encodes a 25–27 kDa virion protein with variable numbers of amino acid repeats". *J Gen Virol*; 76 (5): 1117–1127.
- Tabares E, Sánchez Botija C (1979): "Synthesis of DNA in cells infected with African swine fever virus". *Arch Virol*; 61(1-2):49-59.
- Tabarés E, Marcotegui M, Fernández M, Sánchez-Botija C (1980a): "Proteins specified by African swine fever virus. I. Analysis of viral structural proteins and antigenic properties". *Arch Virol*; 66: 107-117.
- Tabarés E, Martínez J, Ruiz-Gonzalvo F, Sánchez-Botija C (1980b): "Proteins specified by African swine fever virus. II. Analysis of proteins in infected cells and antigenic properties". *Arch Virol*; 66: 119-132.
- Tabarés E, Martínez J, Martín E, Escribano J (1983): "Proteins specified by African swine fever virus. IV. Glycoproteins and phosphoproteins". *Arch Virol*; 77: 167-180.

- Takamatsu H, Denyer MS, Oura C, Childerstone A, Andersen JK, Pullen L, Parkhouse RM (1999): "African swine fever virus: a B cell-mitogenic virus in vivo and in vitro". *J Gen Virol*; 80(6):1453-61.
- Takamatsu HH, Denyer MS, Lacasta A, Stirling CM, Argilaguët JM, Netherton CL, Oura CA, Martins C, Rodríguez F (2013): "Cellular immunity in ASFV responses". *Virus Res*; 173(1):110-21.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013): "MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0". *Mol Biol Evol*; 30(12):2725–2729.
- Thomson GR (1985): "The epidemiology of African swine fever: the role of free-living hosts in Africa". *Onderstepoort J Vet Res*; 52: 201–209.
- Tignon M, Gallardo C, Iscaro C, Hutet E, Van der Stede Y, Kolbasov D, De Mia GM, LePotier MF, Bishop RP, Arias M, Koenen F, (2011): "Development and inter-laboratory validation study of an improved new real-time PCR assay with internal control for detection and laboratory diagnosis of African swine fever virus". *J Virol Methods*; 178:161–170.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979): "Electrophoretic transfer of proteins from gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications". *Proc Natl Acad Sci USA*; 76: 4350-4354.
- Untergrasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG (2012): "Primer3 - new capabilities and interfaces". *Nucleic Acids Research*; 40(15):e115.
- Uttenthal A, Braae UC, Ngowi HA, Rasmussen TB, Nielsen J, Johansen MV (2013): "ASFV in Tanzania: asymptomatic pigs harbor virus of molecular similarity to Georgia2007". *Vet Microbiol*; 165: 173–176.
- Valdeira ML, Geraldes A (1985): "Morphological study on the entry of African swine fever virus into cells". *Biol Cell*; 55(1-2):35-40.
- Valdeira ML, Bernardes C, Cruz B, Geraldes A (1998): "Entry of African swine fever virus into Vero cells and uncoating". *Vet Microbiol*; 60(2-4):131-40.
- Vergne T, Guinat C, Petkova P, Gogin A, Kolbasov D, Blome S, Molia S, Pinto Ferreira J, Wieland B, Nathues H, Pfeiffer DU (2014): "Attitudes and Beliefs of Pig Farmers and Wild Boar Hunters Towards Reporting of African Swine Fever in Bulgaria, Germany and the Western Part of the Russian Federation". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12254.
- Vergne T, Gogin A, Pfeiffer DU (2015): "Statistical Exploration of Local Transmission Routes for African Swine Fever in Pigs in the Russian Federation, 2007-2014". *Transbound Emerg Dis*; doi: 10.1111/tbed.12391.
- Villeda CJ, Williams SM, Wilkinson PJ, Viñuela E (1993): "Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever". *Archives of Virology*; 133: 467-475.

- Viñuela E (1985): "African swine fever virus". *Curr Top Microbiol Immunol*; 116:151-70.
- Viñuela E (1987): "African swine fever virus". In *African swine fever*. Becker Y (Ed). Martinus Nijhoff Publishing, Boston, pp31-49.
- Vlasova NN, Varentsova AA, Shevchenko IV, Zhukov I, Remyga SG, Gavrilova VL, Puzankova OS, Shevtsov AA, Zinyakov NG, Gruzdev KN (2014): "Comparative Analysis of Clinical and Biological Characteristics of African Swine Fever Virus Isolates from 2013 Year Russian Federation". *British Microbiology Research Journal*; 5(3): 203-215.
- Wardley RC, Wilkinson PJ (1977): "The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs". *Arch Virol*; 55(4):327-34.
- Wardley RC, Wilkinson PJ (1980): "Lymphocyte responses to African swine fever virus infection". *Res Vet Sci*; 28(2):185-9.
- Wardley RC, de M Andrade C, Black DN, de Castro Portugal FL, Enjuanes L, Hess WR, Mebus C, Ordas A, Rutili D, Sánchez-Vizcaíno J, Vigario JD, Wilkinson PJ, Moura Nunes JF, Thomson G (1983): "African Swine Fever virus. Brief review". *Arch Virol*; 76: 73-90.
- Wesley RD, Tuthill AE (1984): "Genome relatedness among African swine fever virus field isolates by restriction endonuclease analysis". *Prev Vet Med*; 2: 53-62.
- Wilkinson PJ, Pegram RG, Perry BD, Lemche J, Schels HF (1988): "The distribution of African swine fever virus isolated from *Ornithodoros moubata* in Zambia". *Epidemiol Infect*; 101(3):547-64.
- Wilkinson PJ (1989): "African swine fever virus" in *Virus Infections of Porcines*. Pensaert MB (Ed), Elsevier Science Publishers, Amsterdam; pp. 17-35.
- Wooldridge M, Hartnett E, Cox A, Seaman M (2006): "Quantitative risk assessment case study: smuggled meats as disease vectors". *Rev Sci Tech*; 25(1):105-17.
- Yañez RJ, Rodríguez JM, Nogal ML, Yuste L, Enriquez C, Rodríguez JF, Viñuela E (1995): "Analysis of the complete Nucleotide Sequence of African Swine Fever Virus". *Virology*; 208: 249-278.
- Yu M, Morrissy CJ, Westbury HA (1996): "Strong sequence conservation of African swine fever virus p72 protein provides the molecular basis for its antigenic stability". *Arch Virol*; 141(9): 1795-1802.
- Yutin N, Wolf YI, Raoult D, Koonin EV (2009): "Eukaryotic large nucleo-cytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution". *Viol J*; 6:223.

- Zaberezhnyĭ AD, Aliper TI, Grebennikova TA, Verkhovskii OA, Sánchez-Vizcaíno JM, Mur L, Nepoklonov EA, L'vov DK (2012): "African swine fever in Russian Federation". *Vopr Virusol*; 7(5):4-10.
- Zsak L, Onisk DV, Afonso CL, Rock DL (1993): "Virulent African swine fever virus isolates are neutralized by swine immune serum and by monoclonal antibodies recognizing a 72-kDa viral protein". *Virology*; 196: 596–602.
- Zsak L, Borca MV, Risatti GR, Zsak A, French RA, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Callahan JD, Nelson WM, Rock DL (2005): "Preclinical diagnosis of African swine fever in contact-exposed swine by a real-time PCR assay". *J Clin Microbiol*; 43 (1): 112–119.
- Zsak L, Lu Z, Kutish GF, Neilan JG, Rock DL (1996): "An African swine fever virus virulence-associated gene NL-S with similarity to the herpes simplex virus ICP34.5 gene". *J Virol*; 70(12):8865-71.

Normativa.

1. Europea.

Directiva (92/119/CEE) del Consejo, de 17 de diciembre de 1992, por la que se establecen medidas comunitarias generales para la lucha contra determinadas enfermedades de animales y medidas específicas respecto a la enfermedad vesicular porcina Diario Oficial n° L 062 de 15/03/1993 p. 0069 – 0085.

Directiva (2002/60/CE) del Consejo de 27 de junio de 2002 por la que se establecen disposiciones específicas de lucha contra la peste porcina africana y se modifica, en lo que se refiere a la enfermedad de Teschen y a la peste porcina africana, la Directiva 92/119/CEE 20.7.2002 Diario Oficial de las Comunidades Europeas L 192/27.

Decisión (2003/422/EC) de la Comisión de 26 de mayo de 2003 por la que se aprueba un manual de diagnóstico de la peste porcina africana [notificada con el número C (2003) 1696] (2003/422/CE). 11.6.2003 Diario Oficial de la Unión Europea L 143/35.

Directiva (2010/63/UE) del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. 20.10.2010 Diario Oficial de la Unión Europea L 276/33.

Decisión de ejecución (2014/178/UE) de la Comisión de 27 de marzo de 2014 sobre medidas de control zoosanitarias relativas a la peste porcina africana en determinados Estados miembros [notificada con el número C(2014) 1979] (2014/178/UE). 29.3.2014 Diario Oficial de la Unión Europea L 95/47.

Decisión de ejecución (2014/442/UE) de la Comisión de 7 de julio de 2014 por la que se aprueban los planes de erradicación de la peste porcina africana de los jabalíes en determinadas zonas de Lituania y Polonia [notificada con el número C(2014) 4551]. 9.7.2014 Diario Oficial de la Unión Europea L 200/21.

Decisión de ejecución (UE) 2015/820 de la Comisión de 22 de mayo de 2015 por la que se modifica la Decisión de Ejecución 2014/709/UE sobre medidas de control zoosanitarias relativas a la peste porcina africana en determinados Estados miembros [notificada con el número C(2015) 3373]. 27.5.2015 Diario Oficial de la Unión Europea L 129/41.

Decisión de ejecución (UE) 2015/1405 de la Comisión de 18 de agosto de 2015 que modifica el anexo de la Decisión de Ejecución 2014/709/UE, sobre medidas de control zoosanitarias relativas a la peste porcina africana en determinados Estados miembros, en lo que respecta a las entradas correspondientes a Estonia, Letonia y Lituania [notificada con el número C(2015) 5912]. 19.8.2015 Diario Oficial de la Unión Europea L 218/16.

Decisión de ejecución (UE) 2015/1432 de la Comisión de 25 de agosto de 2015 que modifica el anexo de la Decisión de Ejecución 2014/709/UE, sobre medidas de control zoosanitarias relativas a la peste porcina africana en determinados Estados miembros, en lo que respecta a las entradas correspondientes a Estonia y Lituania [notificada con el número C(2015) 6031]. 27.8.2015 Diario Oficial de la Unión Europea L 224/39.

2. Nacional.

Real Decreto 1201/2005, de 10 de octubre, sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. «BOE» núm. 252, de 21 de octubre de 2005, páginas 34367 a 34391. BOE-A-2005-17344.

Ley 32/2007, de 7 de noviembre, para el cuidado de los animales, en su explotación, transporte, experimentación y sacrificio. «BOE» núm. 268, de 8 de noviembre de 2007, páginas 45914 a 45920. BOE-A-2007-19321.

Real Decreto 53/2013, de 1 de febrero, por el que se establecen las normas básicas aplicables para la protección de los animales utilizados en experimentación y otros fines científicos, incluyendo la docencia. «BOE» núm. 34, de 8 de febrero de 2013, páginas 11370 a 11421. BOE-A-2013-1337.

PROTOCOLOS DISPONIBLES EN LA PÁGINA WEB DEL LABORATORIO DE REFERENCIA EUROPEO PARA LA PESTE PORCINA AFRICANA:

<http://asf-referencelab.info/asf/es/procedures-diagnosis-2/sops>

Tratamiento de las muestras.

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_MUESTRAS_1.pdf

Técnicas de diagnóstico:

Detección del genoma, virus o antígeno viral: **Extracción.**

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_EXTRACCIN_ADN.pdf

Detección del genoma, virus o antígeno viral: **PCR convencional.**

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_1.pdf

Detección del genoma, virus o antígeno viral: **PCR en tiempo real.**

King y col., en 2003:

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_2.pdf

Fernández-Pinero y col., en 2013:

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PCR_3.pdf

Detección del genoma, virus o antígeno viral: **Aislamiento viral.**

Leucocitos porcinos.

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PNTs/PNT_PPA_VI_1.pdf

Macrófagos alveolares porcinos.

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_VI_2.pdf

Detección de anticuerpos. **Técnicas de cribado (ELISA-OIE).**

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_ELISA_1-2014.pdf

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_CISA_PPA_AG%281%29.pdf

Detección de anticuerpos. **Técnicas de confirmación:**

Inmunoblotting.

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_TIRAS_IB_1.pdf

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IB_1%281%29.pdf

Inmunoperoxidasa indirecta.

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_TITULACION_1.pdf

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_PLACAS_IPT_1.pdf

[http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IPT_1\(1\).pdf](http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_IPT_1(1).pdf)

Caracterización molecular: **genotipado convencional.**

http://asf-referencelab.info/asf/images/files/PROTOCOLOS-ES/PNT_PPA_GENOTIPADO.pdf

ANEXO I – AISLADOS SECUENCIADOS

Aislados secuenciados en el EURL entre 2012 y 2015 por orden cronológico de la declaración del brote, con el nombre completo del aislado, país y localidad de origen, hospedador del que proviene, genotipo, y subtipado.

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R - I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Georgia2007	Georgia	Región de Samegrelo , Poti	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG1
Ukr12/Zapo	Ucrania	Región de Zaporozhye	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Bel13/Grodno	Bielorrusia	Región de Grodno, Lelyukinskiy	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
LT14/1482	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
LT14/1490	Lituania	Vilnius, Salcininkai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/Krus	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/Sz	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-Los	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB1-10986	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB2-10986	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB3-10986	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-13119	Polonia	Podlaskie, Sokolka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-13167	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/Kepo1	Letonia	Dienvīdlatgale, Dagdas, Ķepovas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/Kepo2	Letonia	Dienvīdlatgale, Dagdas, Ķepovas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/Robez1	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Robeznieku	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/Robez2	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Robeznieku	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/Robez3	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Robeznieku	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-13713	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/Kepo3	Letonia	Dienvīdlatgale, Dagdas Ķepovas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-13784	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-13785	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/Pied	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Piedrujas	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/Indras1	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Indras	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/Indras2	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslavas, Indras	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14309#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14310#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14311#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14314#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R - I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Pol14/WB-14312#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14313#7	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-14473#8	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-15094#9	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-15590	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-15591	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-15747-1	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-15747-2	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-15747-3	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/VALKA 1	Letonia	Ziemeļvidzeme, Valka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/SKA-1	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslava Skaista,	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-1	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-2	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-3	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-4	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-5	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-6	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-7	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-8	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-9	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-10	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-11	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-12	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-16421#11	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Utena	Lituania	Utena, Utena	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-16606#12	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-16607#12	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-17513#12	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/SKA-2	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslava Skaista	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/DP/SKA-3	Letonia	Dienvīdlatgale, Krāslava Skaista	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/DP-17192#2	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-17397#13	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R - I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Lt14/WB-Ignalina-1	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-13	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-14	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-15	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv14/WB/LAU-1	Letonia	Austrumvidzeme, Madona, Laudona	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Rokiškis	Lituania	Panevezys, Rokiskis	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-18861#14	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-16	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-17	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-18	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/DP-Ignalina-19	Lituania	Utena, Ignalina	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-Valga-1	Estonia	Valga, Hummuli	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-2	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VIL-1	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-Valga-2	Estonia	Valga, Hummuli	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VIL-2	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VIL-3	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VIL-4	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-IDA-1	Estonia	Ida-Viru, Ida-Virumaa	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-1	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-2	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-1	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-3	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-2	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-4	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-6	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-5	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-7	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-8	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-9	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VÖRU-1	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VÖRU-2	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica 173R - 1329L
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Est14/WB-VÕRU-3	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est14/WB-VÕRU-4	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-3	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-4	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-5	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-6	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-7	Lituania	Vilnius, Švenčionys	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-1	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-8	Lituania	Vilnius, Vilnius	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-10	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-11	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-12	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-3	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-13	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-2	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-3	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-4	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-5	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-6	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-9	Lituania	Vilnius, Vilnius	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-10	Lituania	Vilnius, Vilnius	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-7	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-8	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-4	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-9	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-5	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-6	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-21516#15	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23704#16	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23947-2#17	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23942-1#18	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23942-3#18	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R</i> - <i>I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Pol14/WB-23942-4#18	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23942-6#18	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-23943#18	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-24305-1#18	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-24305-2#18	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-24612-#17	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-25744#19	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-28374#20	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-29321#21	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-30011#22	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-30258#23	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-30420#24	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-30459#25	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-30453#25	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-14	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-15	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-31519-16#28	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol14/WB-31519-17#27	Polonia	Podlaskie, Bialostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-16	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-17	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-7	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-8	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Kaunas-1	Lituania	Kaunas, Jonava	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Kupiskis-1	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-9	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-10	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-11	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-11	Lituania	Vilnius, Trakai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Vilnius-12	Lituania	Vilnius, Trakai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-10	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-12	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Rokiškis-13	Lituania	Panevezys, Rokiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R - I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Pol14/WB-32473#30	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-18	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-19	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-20	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-21	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Alytus-22	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Ignalina-11	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-3	Estonia	Valga, Helme	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-4	Estonia	Valga, Põdrala	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-5	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Alytus-23	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Alytus-24	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Alytus-25	Lituania	Alytus, Alytus	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB-DAU-1	Letonia	Dienvīdlatgale, Daugavpils, Vaboles	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-6	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-00847#31	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
LT15/WB-Zarasai-1	Lituania	Utena, Zarasai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
LT15/WB-Zarasai-2	Lituania	Utena, Zarasai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-7	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-8	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-9	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP-01561-1#3	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP-01561-2#3	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÕRU-5	Estonia	Võru, Sõmerpalu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt14/WB-Kupiskis-2	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02062-2#33	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-10	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-11	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-12	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP-0798-3#3	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP-0798-4#3	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/DP-0798-5#3	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica 173R - 1329L
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Pol15/WB-01903#32	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-5	Estonia	Valga, Põdrala	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÕRU-6	Estonia	Võru, Sõmerpalu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-3	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-4	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-5	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-6	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-7	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02064#34	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/LAU-2	Letonia	Austrumvidzeme, Madona, Laudona	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-13	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02231#35	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02232#35	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02234#35	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02809#36	Polonia	Podlaskie, Sokolski	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02976#37	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Pol15/WB-02978#38	Polonia	Podlaskie, Białostocki	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-14	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-8	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Zarasai-3	Lituania	Utena, Zarasai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/LUZ-1	Letonia	Ziemeļlatgale, Ludzas, Pildas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/RENZ-1	Letonia	Ziemeļvidzeme, Burtnieku, Rencēnu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-6	Estonia	Valga, Põdrala	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-7	Estonia	Valga, Põdrala	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-15	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-9	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-16	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-17	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/LIMBA-1	Letonia	Ziemeļpierīgas, Limbažu Umurgas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/LIMBA-2	Letonia	Ziemeļpierīgas, Limbažu, Umurgas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-18	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-19	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R - I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Est15/WB-Valga-8	Estonia	Valga, Helme	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-20	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Zarasai-4	Lituania	Utena, Zarasai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/VALKA3	Letonia	Ziemeļvidzemes, Valkas, Kārķu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil-21	Estonia	Viljandi, Tarvastu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÖRU-7	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÖRU-8	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Zarasai-5	Lituania	Utena, Zarasai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÖRU-9	Estonia	Võru, Varstu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-10	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-11	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-12	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Kupiskis-13	Lituania	Panevezys, Kupiškis	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Ignalina-12	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Ignalina-13	Lituania	Utena, Ignalina	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Vilnius-13	Lituania	Vilnius, Trakai	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lt15/WB-Alytus-26	Lituania	Alytus, Varėna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-9	Estonia	Valga, Puka	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Valga-10	Estonia	Valga, Helme	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Parnu1	Estonia	Parnu, Vändra	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-Tartu1	Estonia	Tartu, Rämsi	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Vil22	Estonia	Viljandi, Viljandi County	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-IDA2	Estonia	Ida-Viru, Lügānuse	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-Tartu1	Estonia	Tartu, Rannu	Jabalí europeo	II	7	GII-RCV2	GII-RIG2
Est15/DP-Vil1	Estonia	Viljandi, Ridaküla	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-Vil2	Estonia	Viljandi, Leie	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-VALGA1	Estonia	Valga, Kibeküla	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-VÖRU-10	Estonia	Võru, Võru county	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-PÖLVA-1	Estonia	Põlva, Põlva	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-RAPLA-1	Estonia	Rapla, Kehtna	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-VALGA2	Estonia	Valga, Kibeküla	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Ukr15/DP1/Kieve	Ucrania	Kieve, Brovarenskyi	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

AISLADO SECUENCIADO	País	Localización	Hospedador	Genotipo P72	Subtipado mediante la RCV		Marcadores adicionales: R. Intergénica <i>I73R</i> - <i>I329L</i>
					Nº Repeticiones	Variante	Variante
Ukr15/DP2/Kieve	Ucrania	Kieve, Brovarskyi	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/WB-JARVA1	Estonia	Järva, Koeru	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-JARVA1	Estonia	Järva, Valsati	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-VALGA3	Estonia	Valga, Kalliküla	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-Tartu2	Estonia	Tartu, Rämsi	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-VIRU1	Estonia	Lääne-Viru, Kamariku	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Est15/DP-Vil3	Estonia	Viljandi, Vooru	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/DP/Dubnas1	Letonia	Dienvīdlatgale, Daugavpils, Dubnas	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/DP/Dubnas2	Letonia	Dienvīdlatgale, Daugavpils, Dubnas	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/DP/Dubnas3	Letonia	Dienvīdlatgale, Daugavpils, Dubnas	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/DP/Zieme1	Letonia	Ziemeļpierīga, Alojas, Staiceles	Cerdo doméstico	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/Malinova1	Letonia	Dienvīdlatgale, Daugavpils, Maļinovas	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/LUZ-2	Letonia	Ziemeļlatgale, Ludzas, Brigu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/Koceni1	Letonia	Ziemeļvidzeme, Kocēnu, Kocēnu	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/Beve-1	Letonia	Ziemeļvidzeme, Beverīna, Trikāta	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2
Lv15/WB/Beve-2	Letonia	Ziemeļvidzeme, Beverīna, Trikāta	Jabalí europeo	II	10	GII-RCV1	GII-RIG2

